

## Anomal swelling af lipide dobbeltlag

Korreman, Stine

*Publication date:*  
1997

*Document Version*  
Også kaldet Forlagets PDF

*Citation for published version (APA):*  
Korreman, S. (1997). *Anomal swelling af lipide dobbeltlag*. Roskilde Universitet. Tekster fra IMFUFA Nr. 332  
<http://milne.ruc.dk/ImfufaTekster/>

### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain.
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact [rucforsk@kb.dk](mailto:rucforsk@kb.dk) providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# **ANOMAL SWELLING AF LIPIDE DOBBELTLAG**

En røntgenspredningsundersøgelse af repeat distance som funktion af temperaturen for multilamellare vesikler af DMPC, DMPC-d54 og DC13PC i excess vandig opløsning

Specialerapport af Stine Sofia Korreman

Vejleder: Dorte Posselt

**TEKSTER fra**

**IMFUFA**

**ROSKILDE UNIVERSITETSCENTER**  
INSTITUT FOR STUDIET AF MATEMATIK OG FYSIK SAMT DERES  
FUNKTIONER I UNDERVISNING, FORSKNING OG ANVENDELSER

IMFUFA, Roskilde Universitetscenter, Postboks 260, DK-4000 Roskilde, Danmark

## ANOMAL SWELLING AF LIPIDE DOBBELTLAG

Specialerapport af: Stine Sofia Korreman

Vejleder: Dorte Posselt

IMFUFA-text no. 332/97      135 sider

ISSN 0106-6242

---

### Abstract:

Swelling opførslen af multilamellare lipide vesikler i excess vandig opløsning undersøges med småvinkel røntgenspredning henover main faseovergangen fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase. Det observeres, at repeat distance udviser anomal opførsel som funktion af temperaturen, bestående af en anomal top omkring faseovergangstemperaturen fulgt af et anomalt fald i den flydende krystallinske fase. Den anomale opførsel skyldes, at main faseovergangen er pseudokritisk, dvs. tæt på et kritisk punkt.

Tre forskellige lipider undersøges; DMPC, deutereret DMPC og DC13PC. DMPC og deutereret DMPC udviser tilnærmelsesvis ens opførsel, mens den anomale top er mere udtalt for DC13PC. Dette skyldes, at main faseovergangen for DC13PC er tættere på det kritiske punkt.

Der er ikke information nok i data til at fitte et potens lov fald, da der er for mange fri parametre. Under antagelse af, at den kritiske eksponent for et potens lov fald har værdien 1, findes gode fit til data (dette kan dog ikke vise, at den kritiske eksponent **skal** være 1, da der ikke er information nok).

Ekspementerne understøtter, at den anomale opførsel sker på grund af stigning af den repulsiv undulationskraft imellem de lipide dobbeltlag i vesiklerne tæt på det kritiske punkt forårsaget af renormalisering af krumningselasticiteten af de enkelte dobbeltlag, og at der godt kan være tale om en kritisk "unbinding" af dobbeltlagene, der afbrydes af main faseovergangen.

# ANOMAL SWELLING AF LIPIDE DOBBELTLAG

En småvinkel røntgenspredningsundersøgelse af  
repeat distance som funktion af temperaturen  
for multilamellare vesikler af DMPC, DMPC-d54 og  
DC13PC i excess vandig opløsning

Specialerapport udarbejdet af:

Stine Sofia Korreman

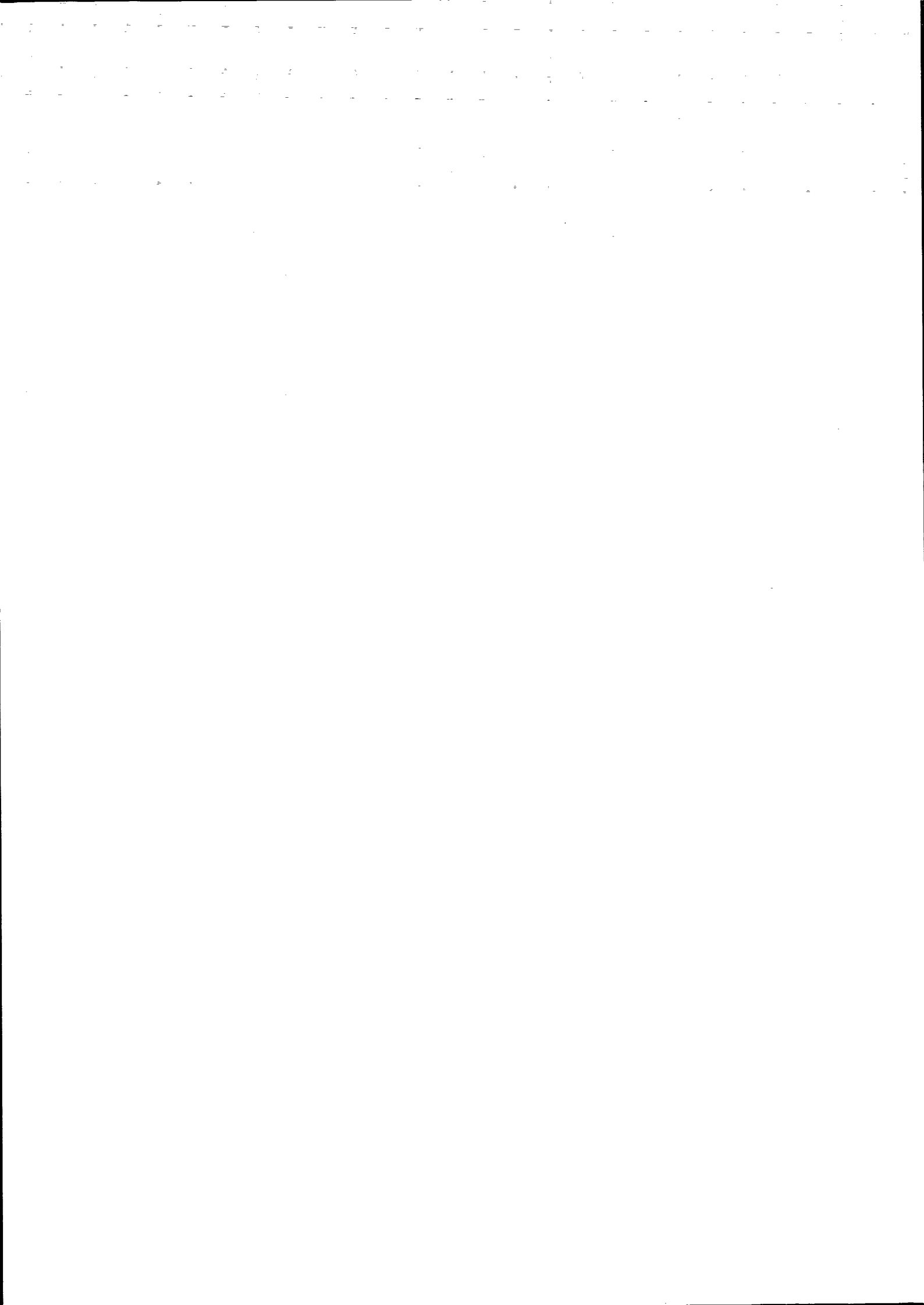
Vejleder:

Dorthe Posselt



# Indhold

<b>1</b>	<b>Introduktion</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Phospholipide membraner</b>	<b>7</b>
2.1	Glycerophospholipiders molekylære struktur . . . . .	8
2.2	Aggregering af lipider . . . . .	9
2.2.1	Den hydrofobiske effekt . . . . .	10
2.2.2	Pakning af fedthalerne . . . . .	13
2.3	Faseopførsel af lipide dobbeltlag . . . . .	14
2.4	Elasticitet af membraner . . . . .	21
2.5	Vekselvirkninger i lipide dobbeltlag . . . . .	23
2.5.1	van der Waals kræfter . . . . .	23
2.5.2	Hydreringskræfter . . . . .	25
2.5.3	Undulationskræfter . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Anomal swelling omkring <math>T_m</math></b>	<b>31</b>
3.1	Anomal top . . . . .	32
3.2	Anomal hældning . . . . .	38
3.3	Opsamling . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Den eksperimentelle metode</b>	<b>43</b>
4.1	Småvinkel røntgenspredning . . . . .	43
4.2	Kratky-kameraet . . . . .	46
4.2.1	Indstilling af kameraet . . . . .	48



4.3	Behandling af data . . . . .	49
4.3.1	Detektortrådens følsomhed . . . . .	49
4.3.2	Fratrækning af baggrund . . . . .	50
4.3.3	Instrumentel desmearing . . . . .	51
4.4	Usikkerheder . . . . .	56
<b>5</b>	<b>Temperatur-kalibrering</b>	<b>59</b>
5.1	Regulering af temperaturen . . . . .	59
5.2	Måling af prøvens temperatur . . . . .	60
5.3	Usikkerheder . . . . .	63
5.3.1	Termisk kontakt imellem loddepunkt og prøve . . . . .	63
5.3.2	Temperaturgradient i prøven . . . . .	63
5.3.3	Rumtemperaturens indflydelse . . . . .	66
5.3.4	Termoelementets nøjagtighed . . . . .	67
5.4	Kalibreringen . . . . .	68
5.5	Ny prøveholder . . . . .	68
5.6	Opsamling . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Eksperimenter</b>	<b>73</b>
6.1	Præparation af prøver og eksperimentel opsætning . . . . .	74
6.2	Forventede eksperimentelle kurver . . . . .	76
6.3	DMPC . . . . .	79
6.3.1	1. serie . . . . .	80
6.3.2	2. serie . . . . .	83
6.3.3	Opsamling . . . . .	85
6.4	DMPC-d54 . . . . .	86
6.4.1	1. serie . . . . .	86
6.4.2	2. serie . . . . .	88
6.4.3	3. serie . . . . .	88
6.4.4	Opsamling . . . . .	90



---

6.5	DC13PC . . . . .	90
6.5.1	1. serie . . . . .	90
6.5.2	2. serie . . . . .	93
6.5.3	3. serie . . . . .	94
6.5.4	Opsamling . . . . .	94
6.6	Opsamling . . . . .	99
<b>7</b>	<b>Resultater</b>	<b>101</b>
7.1	Problemer ved desmearing . . . . .	101
7.2	DMPC . . . . .	104
7.3	DMPC-d54 . . . . .	110
7.4	DC13PC . . . . .	116
7.5	Opsamling . . . . .	121
<b>8</b>	<b>Konklusion og diskussion</b>	<b>123</b>
8.1	Konklusion . . . . .	123
8.2	Diskussion . . . . .	125
	<b>Litteratur</b>	<b>129</b>



# Kapitel 1

## Introduktion

Denne rapport fungerer som specialerapport for undertegnede Stine Sofia Korreman. Projektet er et modul 3 eksperimentelt fysikprojekt på IMFUFA, RUC udført i tidsrummet juli 1994 til august 1995. Vejleder for projektet er Dorthé Posselt.

Da jeg var interesseret i at lave et eksperimentelt speciale og ydermere fattede umiddelbar interesse for bløde materials fysik, henvendte jeg mig i foråret 1994 til Dorthé. Dorthé havde umiddelbart forinden med Ole G. Mouritsen diskuteret muligheden af at udføre småvinkel røntgenspredning målinger på lipide dobbeltlag, og foreslog dette som konkret specialeemne. Diskussionen udsprang af nogle målinger, som i vinteren 1993/1994 var blevet udført med småvinkel neutrons predning på Risø, og som viste en interessant anomali i de lipide dobbeltlags opførsel nær en faseovergang. I juli 1994 påbegyndte jeg så dette projekt med nogle pilotmålinger på Kratky kameraet på IMFUFA (prøverne til disse målinger viste sig desværre at være "defekte", så jeg fik ikke meget ud af piloteksperimenterne udover eksperimentel introduktion til Kratky kameraet). Hele projektet er udført på IMFUFA, men med hjælp til præparation af prøver og analyse af resultater fra Ole G. Mouritsen, Kent Jørgensen og Jesper Lemmich fra FKI, DTU.

Indenfor biofysikken arbejdes der i øjeblikket med at opnå en dybere indsigt i grundlæggende fænomener og egenskaber knyttet til den biologiske membran. Den biologiske membran er en gennemgående struktur i levende organismer, og består hovedsageligt af lipider og proteiner. Lipiderne danner et dynamisk dobbeltlag, hvori proteiner er indlejret. Som et led i undersøgelserne af biologiske membraner bruger man simple modelsystemer bestående af aggregater af lipide dobbeltlag med ingen eller få simple proteiner indlejret. Det er sådanne simple modelsystemer bestående af multilamellare vesikler af lipide dobbeltlag, jeg arbejder med i specialet.



De lipider, jeg undersøger, er meget velkendte lipider, som gennem de sidste 30 år har været grundigt undersøgt med mange forskellige eksperimentelle metoder. Det er fascinerende, at der til stadighed findes nye aspekter ved disse lipider, som det er værd at undersøge.

Det fænomen, som jeg konkret undersøger, består i en nyligt opdaget anomali i den karakteristiske lamellare afstand (repeat distance) som funktion af temperaturen i multilamellare vesikler omkring main faseovergangen. Denne faseovergang er pseudokritisk (tæt på et kritisk punkt), og der er derfor store fluktuationer i vesiklerne tæt på faseovergangstemperaturen. Anomalien er dels observeret med neutronspreddning på RISØ [Hønger et al., 1994], og med højtopløsende røntgenspreddning på CHESS, USA [Zhang et al., 1995]. De to grupper, der har målt anomalien, er dog ikke enige om, hvori den består og hvordan den skal fortolkes.

I [Hønger et al., 1994] observeres en anomali bestående af dels en anomal top efterfulgt af et anomalt fald. Der foreslås en forklaring baseret på renormalisering af dobbeltlagernes krumningselasticitet på grund af store densitetsfluktuationer. Dette forårsager en øget repulsiv undulationskraft imellem dobbeltlagene i vesiklerne, så de frastøder hinanden. Det er altså fortrinsvis i vandlagene imellem dobbeltlagene, at den anomale swelling sker.

I [Zhang et al., 1995] observeres en anomali bestående udelukkende af et anomalt fald i repeat distance. Dette forklares med en model, hvor det er i selve dobbeltlagene anomalien foregår.

Formålet med dette speciale er at bidrage til diskussionen af disse to forklaringsmodeller ved hjælp af yderligere småvinkel røntgenspreddningseksperimenter.

Problemformuleringen for specialet bliver således:

1. Kan der med småvinkel røntgenspreddning observeres en anomal swelling i karakteristikken for repeat distance som funktion af temperatur for multilamellare vesikler i excess vandig opløsning? Hvis ja, hvilken form har anomalien?
2. Afhænger dette af, hvorvidt der benyttes deutererede eller ikke-deutererede lipider?  
(Dette er interessant, da der benyttes deutererede lipider ved neutronspreddning, men ikke-deutererede ved røntgenspreddning.)
3. Hvis en anomal top i swelling opførslen observeres, hvordan påvirkes toppens størrelse da af at fedthale længden af lipiderne sænkes?  
(Herved øges kritikaliteten af faseovergangen.)



4. Hvis en anomal top i swelling opførslen ikke observeres, hvori består da forskellen mellem neutronspretningseksperimenterne og røntgeneksperimenter i denne sammenhæng?
5. Hvilken af de to forklaringsmodeller på den anomale swellingopførsel understøtter mine eksperimenter?

Arbejdet i projektforsøget har bestået af mange forskellige dele, hvis fordeling i forhold til arbejdsbyrde ikke afspejles i den skrevne rapport.

Den teoretiske forståelse af emnet generelt og forståelsen af det konkrete fænomen har krævet et stort arbejde, da jeg på forhånd kun havde få forudsætninger (ét kursus i statistisk mekanik fra Århus Universitet). Jeg vidste intet om bløde materialer og faseovergange og kun ganske lidt om termodynamik i det hele taget. Den forståelse, som jeg har opnået, har jeg skitseret i rapportens to første kapitler, som kun handler om teorien for lipide dobbeltlag og forslagene til forklaringer på det anomale fænomen. Da det er et eksperimentelt speciale, vil størstedelen af rapporten dog være viet til det eksperimentelle arbejde.

En anden meget stor arbejdsbyrde har været at forberede det eksperimentelle udstyr til mine konkrete eksperimenter. Da den faseovergang, som undersøges, sker over et meget snævert temperaturområde, har det været vigtigt at kunne opretholde en god temperaturstabilitet i opstillingen, og udføre gode temperaturkalibreringer. Opstillingen var ikke i forvejen beregnet til målinger med så stor påkrævet stabilitet i temperaturen. Dette har været et stykke arbejde, som har taget flere måneder.

Selve eksperimenterne har ikke været meget tidskrævende, da de - når først de var sat op - har kunnet køre selv om natten. Præparation af en prøve og opsætning af opstillingen har generelt kunne gøres på et par dage, hvorefter en prøve har kunne køre to til tre nætter. Naturligvis er der, som altid med eksperimentel fysik, opstået uforudsete problemer jævnligt som har udskudt og forlænget eksperimenterne (såsom strømafbrydelse på RUC, svigt af kølevandssystem til generatoren, pludseligt svigt af detektoren, defekte prøver, brug af forkert måleprogram etc.).

Analysen af de målte data har dog været en længere affære. Det største problem med analysen har været at "desmeare" de målte data, dvs. udligne spektre for de effekter, som selve måleudstyret tilføjer. Til dette har Otto Glatte (University of Graz) lavet et program, som jeg har brugt [Glatte og Gruber, 1993]. Det har dog langt fra været uproblematisk, og for flere måleserier har jeg måttet gøre det om flere gange. Den eksperimen-





telle metode, eksperimenterne og analysen af data præsenteres i tre kapitler i rapporten.

For at fremme min forståelse af både teori og eksperimenter har jeg i projektforløbet fulgt tre kurser indenfor ph.d.programmet "Soft Materials Science"; "Statistical Physics and Soft Materials", "Scattering Methods" (ved Otto Glatter) og "Methods in Soft Materials Science".

Til sidst vil jeg nævne, at jeg deltog i Dansk Fysisk Selskabs årsmøde i Odense i maj 1995 med en poster omkring mine eksperimenter.

### Læsevejledning til rapporten

#### **Kapitel 2: Phospholipide membraner:**

I dette kapitel gives en kort indføring i den vigtigste teori, der ligger til grund for forståelsen af multilamellare vesiklers struktur og dynamik.

#### **Kapitel 3: Anomal swelling omkring $T_m$ :**

Her introduceres den anomale swelling opførsel, som jeg beskæftiger mig med samt de foreslåede fortolkninger af fænomenet. Til sidst gives en beskrivelse af, hvordan dette speciale kan bidrage til diskussionen af fænomenet.

#### **Kapitel 4: Den eksperimentelle metode:**

Småvinkel røntgenspredning gennemgås i forbindelse med Bragg-spredning. Den konkrete måleopstilling med Kratky kameraet skitseres, og jeg forklarer, hvordan behandling af de målte data foregår. Usikkerheden på de målte data behandles.

#### **Kapitel 5: Temperatur-kalibrering:**

I dette kapitel beskriver jeg, hvordan jeg har grebet temperaturkalibreringen an. Usikkerhedsmomenter i forbindelse med måling af temperaturen og temperaturens stabilitet gennemgås. En skitse for en ny prøveholder introduceres. Dette er et meget praktisk anlagt kapitel, som man kan springe over, hvis emnet ikke har interesse.

#### **Kapitel 6: Eksperimenter:**

Her præsenteres de målte data. Jeg sammenligner med forventede data, og forsøger at trække så megen information ud af de rå data som muligt. Allerede her ses de første resultater.

#### **Kapitel 7: Resultater:**

De rå data desmeares, og karakteristikker for repeat distance vises. I starten af kapitlet forklarer jeg om de problemer, der er ved desmearing. I dette kapitel præsenteres de fleste resultater inkl. anomaliens form, fitning af potens love med kritiske eksponenter til anomalien samt lipidet DC13PC's opførsel.

#### **Kapitel 8: Konklusion og diskussion.**



Jeg har igennem rapporten valgt at bruge de engelske ord for begreber, som jeg har fundet det svært at oversætte tilfredsstillende. Det gælder f.eks. "smearing" og "desmearing" (udsmøring og afsmøring!), "repeat distance" (gentagelseslængde), "main" faseovergang m.fl..

Jeg vil gerne sige tak til Dorthé Posselt for at have været en god vejleder, altid parat til at lytte til og diskutere mine idéer og til at hjælpe mig med eksperimenterne, til Kent Jørgensen for at have hjulpet med præparation af prøver, til Ole G. Mouritsen for at hjulpet mig igang og vurderet mine resultater undervejs samt til Joe for at have været villig til at diskutere mine problemer undervejs, have hjulpet med korrekturlæsning i slutfasen og i det hele taget have været meget tålmodig.





## Kapitel 2

# Phospholipide membraner

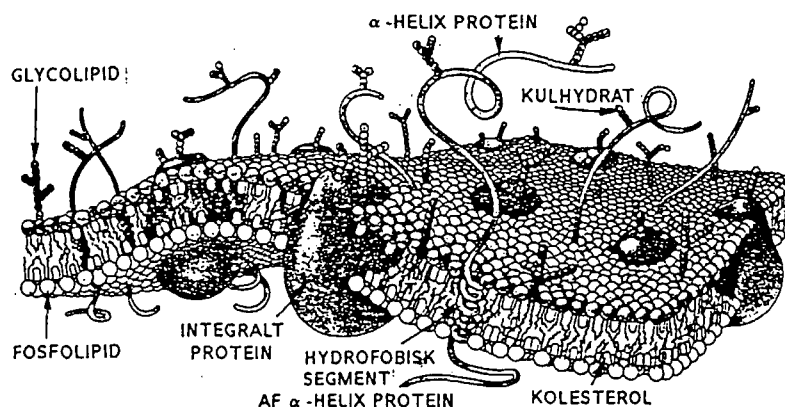
Lipide dobbeltlag udgør hovedbestanddelen af biomembraner, som er en vigtig struktur i levende celler. Generelt er biomembraner meget komplekse strukturer, der består af lipider, proteiner, enzymer, kulhydrater og kolesterol, men som det ses illustreret i figur 2.1 er det lipide dobbeltlag den grundlæggende struktur. De hyppigst forekommende lipider i biomembraner er de såkaldte glycerophospholipider [Cevc and Marsh], og når jeg i det følgende omtaler phospholipider er det kun disse lipider, der refereres til.

Når man i den eksperimentelle fysik undersøger systemer, er formålet som oftest at fastlægge opførslen af få simple fysiske størrelser ved variation af få parametre. Jo mere komplekst systemet er, jo flere frihedsgrader er der i det, og jo vanskeligere er det at karakterisere dets opførsel. Hvis man vil undersøge et meget komplekst system, som f.eks. biomembraner, kan man vælge at udforme en eksperimentel model, som man istedet kan undersøge. Den eksperimentelle model er et idealiseret og veldefineret system, som kun indeholder få af det oprindelige systems egenskaber.

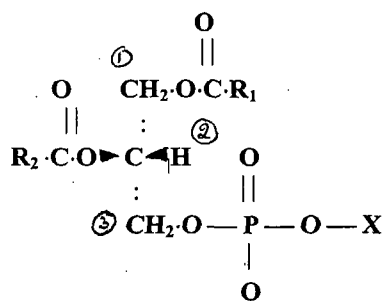
Som model for biomembraner vil jeg i dette speciale bruge det rene phospholipide dobbeltlag, og undersøge dets strukturelle egenskaber i et snævert biologisk interessant temperaturområde (5 – 30° C).

I dette kapitel vil jeg skitsere de grundlæggende fysiske karakteristika af phospholipider i den grad, jeg finder det formålstjenligt for resten af rapporten. Dette omfatter deres molekyllære struktur, aggregeringer, deres faseopførsel, vekselvirkninger imellem dobbeltlag og de makroskopiske fysiske størrelser, der karakteriserer dobbeltlag (f.eks. elasticitet).





Figur 2.1: Skematisk fremstilling af en biologisk membran [Mouritsen, 1991a].



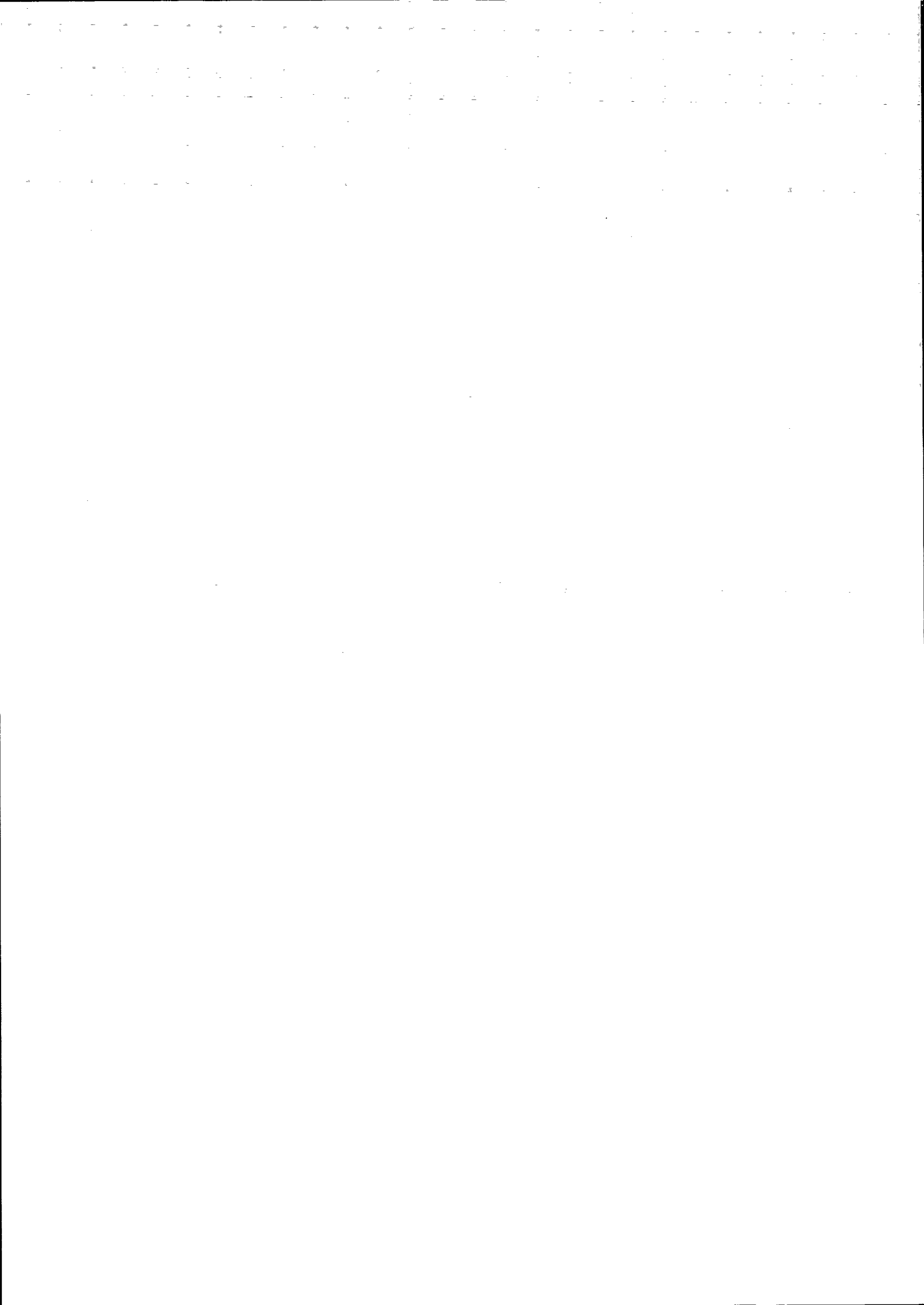
Figur 2.2: Glycerophospholipider. De indrammede tal angiver den stereospecifikke nummerering [Cevc and Marsh].

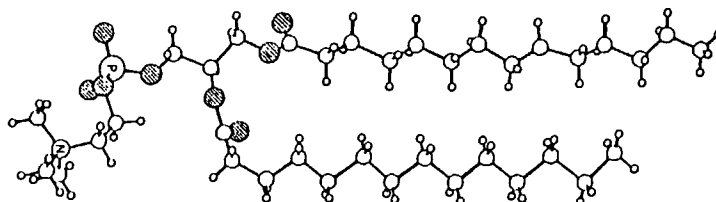
## 2.1 Glycerophospholipiders molekylære struktur

Næsten alle i naturen forekommende phospholipider består af en glycerol backbone (se figur 2.2) og en eller to alkyl/acyl-kæder også kaldet lipidets hale(r) [Cevc]. Phosphorsyren ( $H_3PO_4$ ) i hovedgruppen er så godt som altid substitueret på glycerolens tredje plads (med stereospecifik nummerering som vist på figur 2.2), mens kæderne er substitueret på første og anden plads.

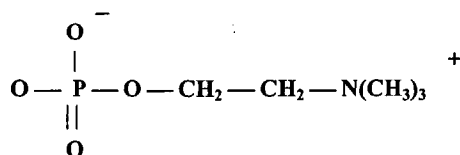
De lipider, jeg vil beskæftige mig med, har gruppen choline esterificeret på fosphaten, og hovedgruppen kaldes dermed phosphatidylcholine:







Figur 2.3: Et dimyristoyl phosphatidylcholine molekyle [Pearson og Pascher, 1979].



Der er altså tale om en neutral hovedgruppe, der dog har et permanent dipolmoment stammende fra de to ladninger med modsat fortegn på henholdsvis choline og oxygenatomet. Dette kaldes en zwitterionisk hovedgruppe. Phosphocholine er en af de hyppigst forekommende hovedgrupper på lipider, der forekommer i naturen.

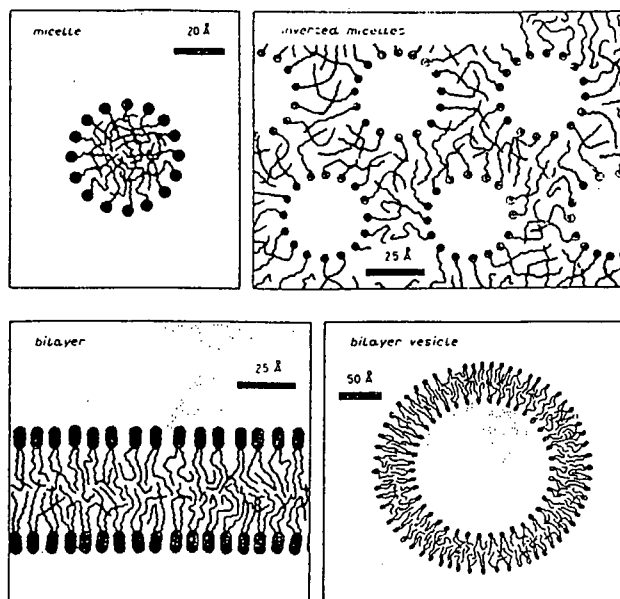
Der er to mættede identiske fedtsyrehaler på de lipider, jeg vil beskæftige mig med; de er navngivet efter kædelængden, dvs. antallet af methylengrupper i kæderne. Jeg vil kun beskæftige mig med kædelængder fra 12 til 14 methylengrupper, og deres navngivning er angivet i tabellen nedenfor.

Symbol	Systematisk navn	Alm. navn	Struktur
12:0	dodecanoyl	lauroyl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
13:0	tridecanoyl	- (DC13)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$
14:0	tetradecanoyl	myristoyl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

Lipidet med to fedthalekæder med 14 methylengrupper vil således alt i alt komme til at hedde 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine eller bare dimyristoyl phosphatidylcholine, forkortet DMPC. Forkortelserne for de fire lipider, jeg vil beskæftige mig med, bliver således DLPC, DC13PC og DMPC. Disse forkortelser vil jeg bruge i resten af rapporten. I figur 2.3 er vist et helt DMPC molekyle.

## 2.2 Aggregering af lipider

Når lipider opløses i vand, strukturerer de sig spontant i større grupper af lipider; aggregater. Disse aggregater kan have forskellige former alt efter hvilke lipider, der er tale om, og hvilke betingelser, der er for systemet. De mest



Figur 2.4: De mest almindelige aggregater af lipider [Degiorgio].

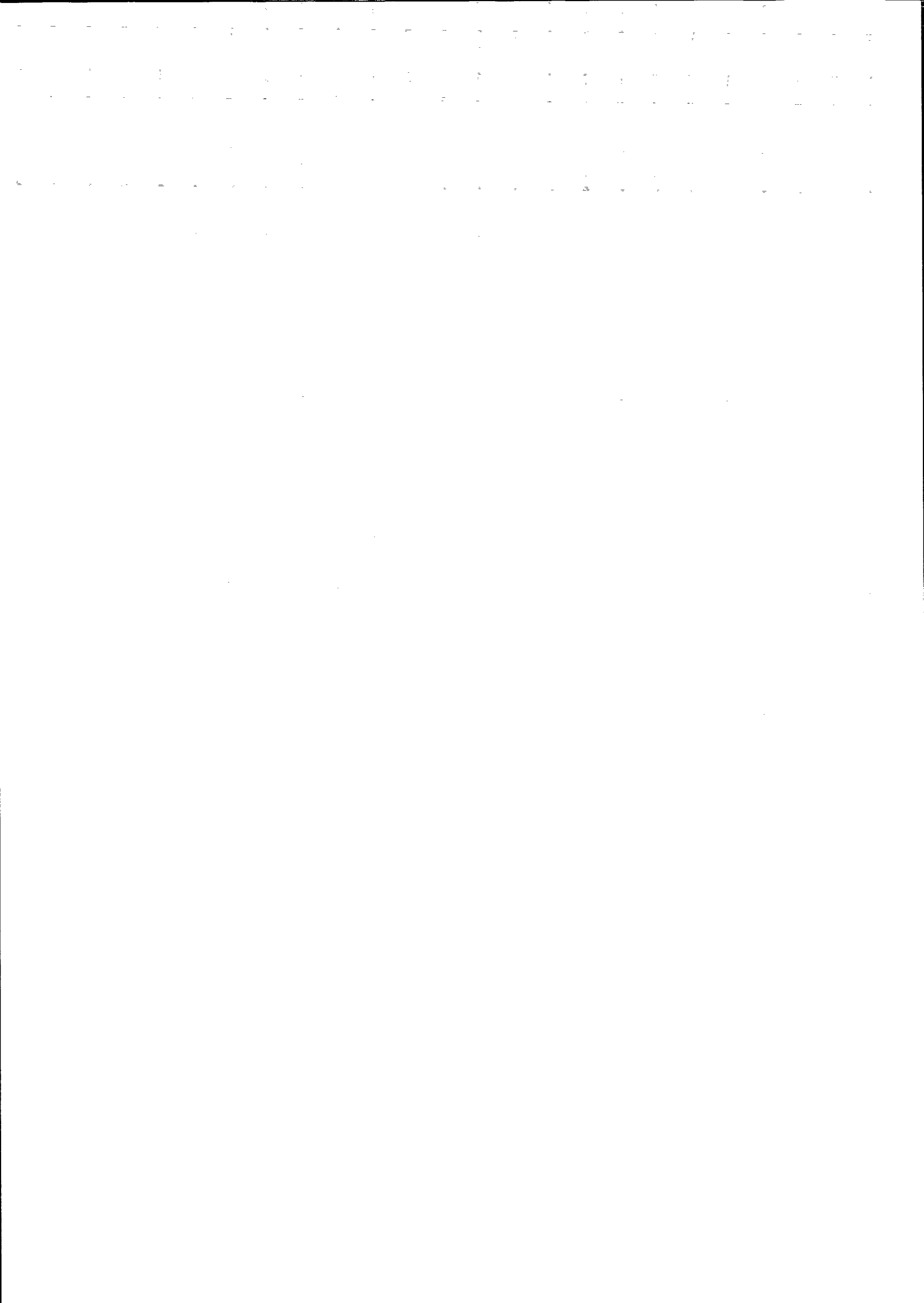
almindelige aggregater er miceller, inverse miceller, dobbeltlag og vesikler af dobbeltlag [Cevc]; strukturerne af disse aggregater er vist i figur 2.4.

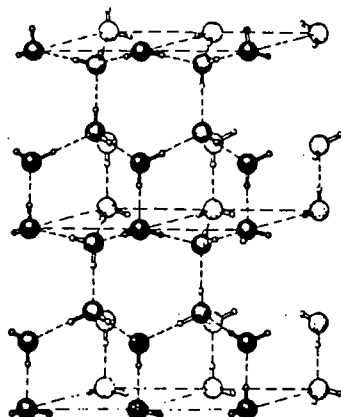
Drivkraften for disse aggregeringer er den hydrofobiske effekt. Lipidernes polære hovedgrupper er tilbøjelige til at danne brintbindinger med vandet, som det opløses i, mens dette ikke er tilfældet for fedtsyrehalerne. De vil så vidt muligt undgå at komme i kontakt med vandet, og for at opnå dette dannes aggregater, så fedtsyrehalerne indkapsles.

### 2.2.1 Den hydrofobiske effekt

Ordet "hydrofob" kommer oprindeligt fra græsk og betyder vandskyende. Det modsatte af hydrofob er "hydrofil", som altså betyder vandelskende. Lipider er såkaldte amfifile molekyler; det vil sige, at de både har en hydrofil del (hovedgruppen) og en hydrofob del (halerne) (nogen steder kaldes sådanne molekyler også amfipatiske).

Vand er en højt struktureret væske med brintbindinger imellem de enkelte molekyler (et vandmolekyles hydrogen atom indgår i en brintbinding med et andet vandmolekyles oxygen atom), der gør at molekylerne er ordnet i en forholdsvis fast struktur. En brintbinding er en meget stærk binding (ca. 10-40 kJ/mol), stærkere end van der Waals kræfter kan give anledning til (se afsnit 2.5), men dog svagere end en covalent binding. En brintbinding skyldes





**Figur 2.5:** Strukturen af is. Vandmolekylerne er ordnet i en tetraeder struktur. De småt-stiplede linier angiver brintbindinger [Tanford].

elektrostatisk dipol-dipol vekselvirkninger, og kan blive så stærk på grund af hydrogen atomets evne til at blive stærkt polariseret samt dets lille størrelse [Tanford]. Specielt for vand spiller brintbindinger en stor rolle, idet hvert vandmolekyle kan indgå fire brintbindinger med andre vandmolekyler; to via dets egne to hydrogen atomer og to via oxygen atomets ikke-covalent-delte elektroner i yderste skal. Bulk vand antager derfor højst sandsynligt lokalt en tetraeder struktur, hvor hvert vandmolekyle har fire nærmeste naboer (i figur 2.5 er tetraeder strukturen for is vist) [Tanford].

Hvis man prøver at opløse et fremmed molekyle i vand, vil denne struktur uværgeligt blive brudt. Hvis det, man prøver at opløse, er et polært molekyle, vil der dannes nye brintbindinger. Hvis det ikke er polært (f.eks. en hydrocarbon kæde), kan der ikke dannes brintbindinger imellem vandet og det fremmede molekyle, og vandmolekylerne vil så omorganisere sig omkring det fremmede molekyle i den struktur, der er mest fordelagtig [Tanford], dvs. giver den laveste frie energi.

Den fri energi er Gibb's fri energi, der også er givet som

$$G = U + pV - TS = H - TS \quad (2.1)$$

(Dette er den fri energi for systemer med fastholdt temperatur og fastholdt tryk.)  $H$  er enthalpi,  $S$  er entropi og  $T$  er systemets temperatur. Ændringen i Gibb's fri energi er

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.2)$$

og kan altså opdeles i et enthalpisk bidrag og et entropisk bidrag. Ved overførsel af et amfifilt molekyle til vand knytter det enthalpiske led sig til brydning



og dannelse af covalente bindinger og brint-bindinger samt van der Waalske vekselvirkninger (se afsnit 2.5), mens det entropiske led knytter sig til omstruktureringer af vandmolekylerne ved bevaring af bindinger. Man kan eksperimentelt bestemme de to led, og dette er gjort for hydrocarbon molekyler. Ændringen i den fri energi er, som man kan forvente, positiv (det vil sige den fri energi af opløsningen er større end den fri energi af bulk vand plus hydrocarbon molekyle, så opløsningen er mindre energetisk fordelagtig). Den enthalpiske del viser sig at give et lille enten positivt eller negativt bidrag, mens den entropiske del giver et stort positivt bidrag [Tanford]. Entropien ved overførsel af et hydrocarbon molekyle til vandig opløsning er altid negativ, mens enthalpien altså kan være positiv eller negativ. Brintbindingerne i vandet bibeholdes, men en mere ordnet struktur omkring det fremmede molekyle formes, der fører til en lavere entropi.

Den hydrofobiske effekt kaldes derfor en entropisk effekt, og kræfter, der drives af ændringer i den entropiske del af den fri energi, kaldes også entropiske kræfter<sup>1</sup>. At der kan være et negativt enthalpisk bidrag må siges at være overraskende, da det betyder, at den omstrukturering, som vandet undergår (hvor der ikke dannes brintbindinger med det fremmede molekyle) kan resultere i en mere enthalpisk fordelagtig struktur end den tetraeder struktur, som bulk vand har.

Den hydrofobiske effekt består således i, at visse molekyler, der ikke kan danne bindinger med vand, istedet tvinger vandmolekylerne til at omstrukturere sig lokalt. Dette resulterer i den struktur, der er mest favorabel (og enthalpisk set måske endda mere favorabel end bulk vand), men som på grund af stor entropiændring stadig er højst ufavorabel i forhold til bulk vand.

Amfifile molekyler har som sagt både en hydrofob og en hydrofil del. Hvis mange amfifile molekyler opløses i vand er det klart, at det mest fordelagtige vil være, at de hydrofobe dele kan afskærmes fra vandet, så det kun er de hydrofile dele, der har kontakt. Dette opnås ved, at molekylerne aggregerer i strukturer, der indkapsler de hydrofobe dele; for phospholipider fedthalerne. Hvilke former for aggregater, der forekommer, afhænger fortrinsvis af de amfifile molekylers geometriske struktur.

---

<sup>1</sup>Entropiske kræfter har således en statistisk beskrivelse, men kan i bund og grund tilskrives elektrostatiske kræfter knyttet til vekselvirkninger mellem atomerne og molekylerne i det system, der er tale om.





### 2.2.2 Pakning af fedthalerne

Forskellige lipider aggregerer i forskellige strukturer, bestemt fortrinsvis ved lipidernes form (dette kalder man også, hvordan lipiderne pakker.) Andre forhold, der kan medvirke til at bestemme, hvilke aggregater, der forekommer i en opløsning er parametre som temperatur, tryk, pH, saltkoncentration etc.. Jeg har allerede angivet hvilke aggregater, der er de hyppigst forekommende (se figur 2.4).

I de geometriske overvejelser omkring hvilke typer aggregater, de forskellige lipider danner, indgår der en essentiel parameter; den kritiske længde af et lipid  $l_c$ . Denne størrelse er et mål for den maksimale længde af en udstrakt lipid hydrocarbon kæde (den er dog lidt mindre, idet der her er tale om "flydende" kæder (se også afsnit 2.3), og der er en grænse for, hvor langt en kæde kan strækkes, hvis den samtidig skal kunne kaldes flydende [Degiorgio]). Derudover indgår tværsnitsarealet af en kæde ( $a_0$ ) og kædens specifikke volumen ( $v$ ). Eksperimentelt har man fundet, at volumenet af flydende kæder kan skrives på formen

$$v \approx (27.4 + 26.9n_c) \text{ \AA}^3 \quad (2.3)$$

hvor  $n_c$  er hydrocarbonkædens længde [Cevc and Marsh].

For en sfærisk micelle må volumenet af en hydrocarbon kæde være givet som

$$v = \frac{4\pi R^3}{3m} \quad (2.4)$$

hvor  $R$  er radius af micellen og  $m$  er antallet af lipider i micellen, også kaldet aggregeringstallet. Sammenhængen mellem aggregeringstallet og arealet er givet som

$$a_0 = \frac{4\pi R^2}{m} \quad (2.5)$$

Hvis disse to udtryk sammenholdes med ligning 2.3, vil man for nogle lipider finde, at når der indsættes kendte værdier for  $v$ ,  $a_0$  og  $l_c$ , vil  $R$  overskride den kritiske længde,  $l_c$ , for lipidets hydrocarbon kæder, og disse lipider kan derfor ikke danne sfæriske miceller [Cevc and Marsh], [Degiorgio]. Betingelsen for at lipider kan danne et bestemt aggregat, f.eks. sfæriske miceller, kan generelt formuleres ved hjælp af den såkaldte kritiske pakkeparameter, som er givet ved  $\frac{v}{a_0 l_c}$ . For sfæriske miceller skal denne være mindre end  $\frac{1}{3}$ . Lipider med en kritisk pakkeparameter, som overskrider denne størrelse, kan altså ikke danne sfæriske miceller. De kan så indgå i andre former for aggregater som f.eks. miceller af andre former (cylindre, ellipsoider etc.), inverterede miceller eller dobbeltlag. Man kan opstille ligninger svarende til ligning 2.4 for alle



de forskellige former for aggregater, og derved finde betingelserne (udtrykt ved hjælp af den kritiske pakkeparameter) for, at lipider indgår i dem. En oversigt over disse overvejelser for de mest almindelige former for aggregater er vist i figur 2.6.

De lipider, jeg arbejder med, aggregerer spontant i dobbeltlag under mange forhold. Et dobbeltlag folder ind i sig selv, og danner således en lukket struktur, der omslutter opløsning, og selv er omsluttet af opløsning. En sådan struktur kaldes en vesikel (eller liposom). Vesikler kan dannes i en løgstruktur, så flere vesikler omslutter hinanden i en såkaldt multilamellar vesikel (se figur 2.7). En enkelt vesikel kaldes i samme terminologi en unilamellar vesikel.

I ovenstående beskrivelse kunne en vesikel i princippet blive uendeligt stor. I praksis har vesikler en optimal størrelse på grund af hydrofiliteten af de polære hoveder og repulsive kræfter imellem hovederne (det sidste især for lipider med ladede hovedgrupper). Det mest optimale for et polært hoved er at danne brintbindinger til det omgivende vand. Antallet af brintbindinger, hovederne i en vesikel kan danne, afhænger af krumningen af dobbeltlaget og dermed af vesiklernes størrelse. Der vil være en given størrelse, hvor antallet af brintbindinger er optimalt i forhold til afskærmningen af de hydrofobe haler. Dette kaldes opponerende kræfters princip.

## 2.3 Faseopførsel af lipide dobbeltlag

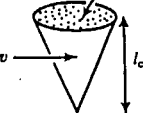
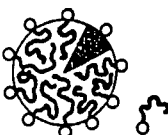

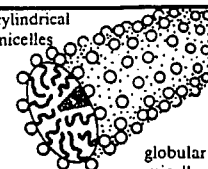
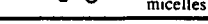
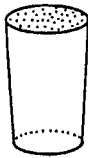
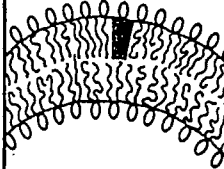

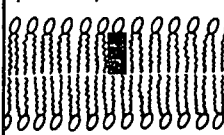

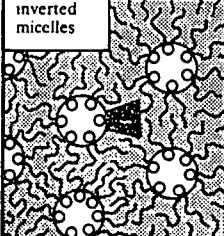
Lipide dobbeltlag har en kompleks lyotropisk og termotropisk<sup>2</sup> faseopførsel både internt i lagene og eksternt i forhold til opløsningen. Jeg vil fortrinsvis beskæftige mig med forholdene inde i dobbeltlagene, som er associerede til forskellige konformationer af halerne og forskellige ordninger af hovederne. Det er et meget velundersøgt område, og mange forskellige eksperimentelle metoder har været brugt til undersøgelser af disse forhold [Cevc].

Fra [Janiak et al., 1979] har jeg hentet fasediagrammet for multilamellare vesikler af DMPC i vandopløsning vist i figur 2.8.

Figuren viser DMPC's faseopførsel i temperaturområdet fra  $-10$  til  $60^{\circ}\text{C}$  og ved vandkoncentrationer fra 0 til 60%. De tre faser, der kaldes  $L_{\beta'}$ ,  $P_{\beta'}$  og  $L_{\alpha}$  er de interessante faser i forbindelse med dette projekt.  $L_{\beta'}^3$  er en fase, hvor

<sup>2</sup>Dvs. parametrene i fasediagrammer er koncentration og temperatur af lipider i forhold til solvent.

<sup>3</sup>Mærkerne på  $\beta'$ et angiver, at halerne hælder (tilter) i forhold til normalen på dobbeltlaget som vist yderst til højre på figur 2.8.

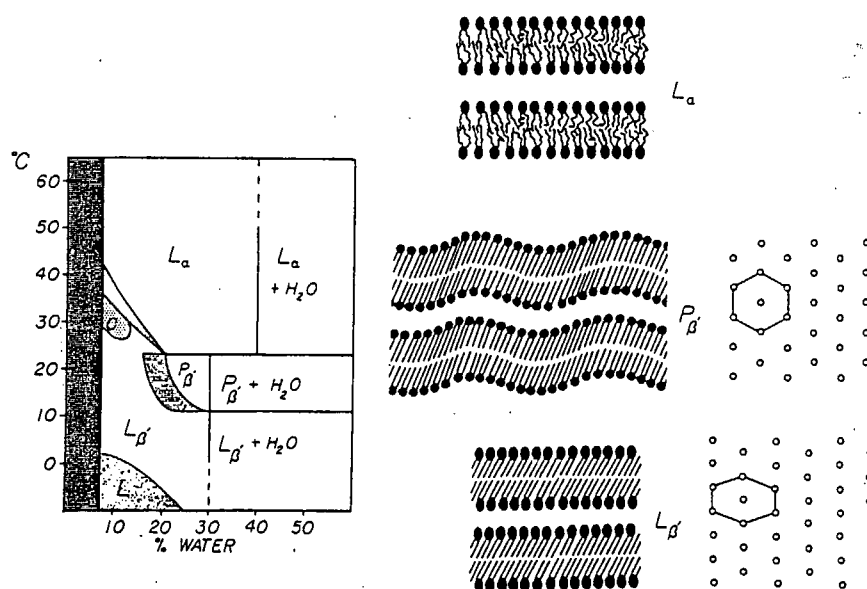
Lipid	Critical packing parameter $v/a_0 l_c$	Critical packing shape	Structures formed
Single-chained lipids with large head-group areas: NaDS in low salt some lysophospholipids	$< \frac{1}{2}$	cone 	spherical micelles 
Single-chained lipids with small head-group areas: NaDS in high salt C <sub>16</sub> TAB in high salt, lysolecithin nonionic surfactants	$\frac{1}{2} - \frac{1}{3}$	truncated cone or wedge 	cylindrical micelles  globular micelles 
Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: (C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> DAB, lecithin, sphingomyelin, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol phosphatidylinositol, phosphatidic acid disugardiglycerides	$\frac{1}{3} - 1$	truncated cone 	vesicles, flexible bilayers 
Double-chained lipids with small head-group areas: anionic lipids in high salt saturated frozen chains, e.g. phosphatidylethanolamine phosphatidylserine + Ca <sup>2+</sup>	$\sim 1$	cylinder 	planar bilayers 
Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly (cis) unsaturated chains, high T: unsaturated phosphatidylethanolamine Cardiolipin + Ca <sup>2+</sup> phosphatidic acid + Ca <sup>2+</sup> monosugardiglycerides, cholesterol (rigid)	$> 1$	inverted truncated cone 	inverted micelles 

Figur 2.6: Pakning af lipider med forskellig geometri [Degiorgio].



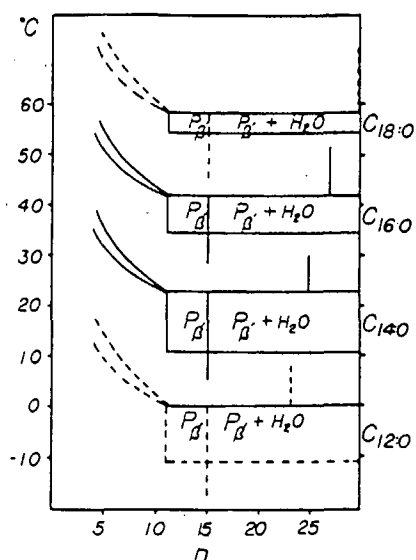


Figur 2.7: Et "freeze fracture" billede af en multilamellar vesikel fundet i Zubay: "Biochemistry", MacMillan, 1988.



Figur 2.8: Fasediagram for DMPC [Janiak et al., 1979].



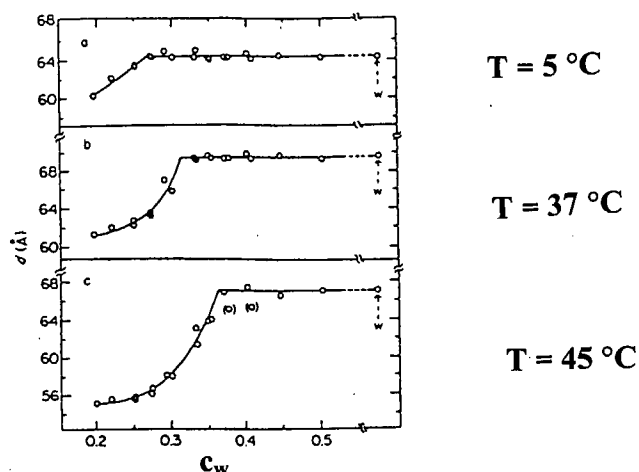


Figur 2.9: Skitser af en del af faseogrammerne for lipiderne DLPC, DMPC, DPPC og DSPC foreslået i [Janiak et al., 1979]. De fuldt optrukne linier er eksperimentelt bestemte faseovergange, mens de stiplede linier er forslag til faseovergange.  $n$  er antallet af vandmolekyler pr. lipid molekyle.

halerne er udstrakte og ordnede i en krystallinsk struktur (som vist til højre på figuren). Denne fase kaldes også gel fasen. I  $P_{\beta'}$  fasen er halerne ligeledes ordnet i denne krystallinske struktur, men hele dobbeltlaget er "bølget". Denne fase kaldes også "ripple" fasen. Overgangen mellem gel fasen og ripple fasen kaldes "pretransition". I  $L_{\alpha}$  fasen er halerne i en uordnet flydende struktur med mange mulige konformationer, og denne fase kaldes den flydende krystallinske fase. Overgangen til  $L_{\alpha}$  kaldes "main" faseovergangen. Lipider af samme slags, men blot med andre halelængder, DLPC (12 methylen-grupper), DPPC (16 grupper) og DSPC (18 grupper) har lignende faseogrammer; blot er de forskudt i forhold til temperaturen, således at jo større halelængden er, jo højere er faseovergangstemperaturerne. Dette er illustreret i figur 2.9, som er hentet fra samme artikel som figur 2.8.

For vandkoncentrationer over ca. 25 – 30% (vægtprocent) (lidt afhængigt af hvilket lipid, der er tale om) er der mere vand end dobbeltlagene kan optage imellem sig, så der er overskydende vand imellem vesiklerne. Denne tilstand kaldes "excess water". Tykkelsen af vandlaget imellem dobbeltlagene stiger med vandkoncentrationen i opløsningen, så længe koncentrationen er under ca. 25%. Derefter er tykkelsen konstant, og yderligere øgning af koncentrationen medfører blot mere vand i den overskydende vandfase (se figur 2.10).

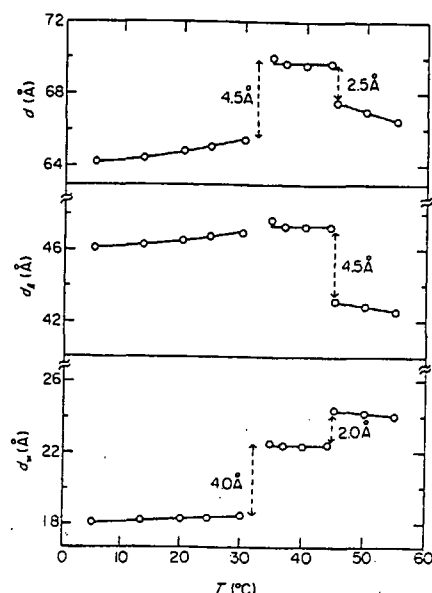




**Figur 2.10:** Tykkelsen af vandlaget imellem dobbeltlagene i multilamellare vesikler af DPPC som funktion af vandkoncentrationen (i vægtprocent) ved tre forskellige temperaturer [Inoko og Mitsui, 1978].

Dette kaldes også dobbeltlagenes swelling opførsel. Dobbeltlagenes struktur og størrelse i de forskellige faser og ved forskellige forhold, såsom tryk, vandkoncentration, saltkoncentration etc. er grundigt undersøgt specielt i 1970'erne ([Inoko og Mitsui, 1978], [Janiak et al., 1979], [Tardieu og Luzzati, 1973] kan f.eks. nævnes). Her vil jeg specielt referere resultaterne fra [Inoko og Mitsui, 1978], idet de opdeler dobbeltlagenes repeat distance i to bidrag; vandlagets tykkelse og selve lipidlagets tykkelse. Ved hjælp af røntgendiffraktion på hhv. multilamellare og unilamellare vesikler vises det, at repeat distance i en multilamellar vesikel falder ved overgangen fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase, og at dette fald må tilskrives et fald i selve lipidlagets tykkelse. Halernes gennemsnitslængde (i retning normalt på laget) må da også falde, idet de går fra at være fuldt udstrakte til at have op til flere buk og hak. Vandlagets tykkelse derimod stiger svagt henover main faseovergangen (se figur 2.11). Disse karakteristikker er beregnet på en simpel måde udfra den samlede repeat distance under antagelse af givne specifikke volumener af lipidene i de to faser.

Dette projekt beskæftiger sig fortrinsvis med overgangen fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase, dvs. main faseovergangen. Denne overgang kaldes ofte også halernes smelte-overgang, da ændringen fra den store orden i halernes konformationer i ripple fasen til mindre orden i den flydende fase minder meget om en smeltning. Main faseovergangen er dog ikke en 1. ordens faseovergang som smeltninger almindeligvis er. Det er en såkaldt **svag** 1. ordens faseovergang [Doniach, 1978], [Mitaku et al., 1983], [Hatta et al., 1984], [Mouritsen, 1991b]. Det vil sige at den indeholder elementer af både en 1. or-

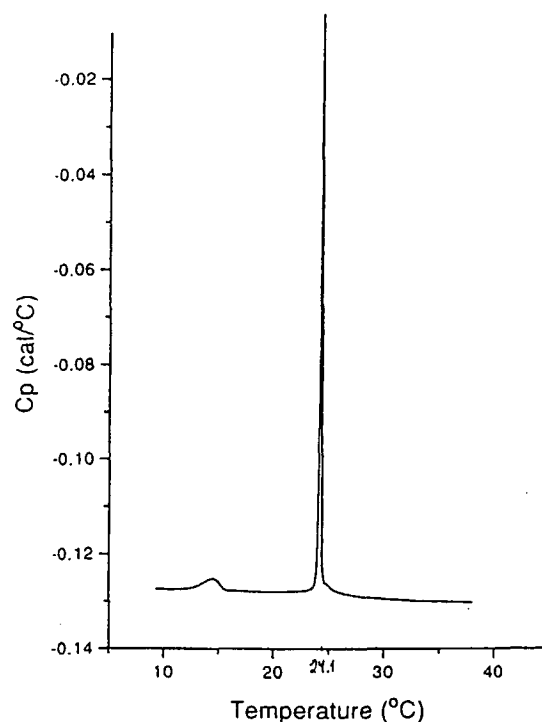


**Figur 2.11:** Repeat distance ( $d$ ) som funktion af temperatur for dobbeltlag i en multilamellar DPPC vesikel, og opdeling i lipid lagets tykkelse ( $d_l$ ) og vandlagets tykkelse ( $d_w$ ). Både pretransition og main transition gennemløbes. [Inoko og Mitsui, 1978].

dens og en kontinuert (2. ordens) faseovergang. Man kan sige, at det er en faseovergang, der er tæt på et kritisk punkt, hvor det går fra at være en 1. ordens til at være en kontinuert faseovergang. Overgangen siges da også at være pseudokritisk, således at faseovergangstemperaturen  $T_m$  ligger tæt på en pseudokritisk temperatur  $T^*$ , som kun ville nås hvis overgangen var en ægte kontinuert overgang.

Systemet går så at sige igang med at udføre en kontinuert faseovergang, når temperaturen sænkes fra den flydende krystallinske fase - der optræder voksende fluktuationer og responsfunktioner begynder som følge heraf at divergere - men inden det kritiske punkt nås, overtages denne opførsel af en 1. ordens faseovergang til ripple fasen med diskontinuerte ændringer i responsfunktionerne. Divergenserne i responsfunktionerne under en kontinuert faseovergang udviser potens lov opførsel [Goldenfeld] som funktion af temperaturens afstand fra det kritiske punkt, og eksponenterne i disse afhængigheder kaldes de kritiske eksponenter. Kritiske eksponenter er universelle for kontinuerte faseovergange, og universalitetsklassen afhænger kun af få parametre (som f.eks. dimensionen af rummet) [Yeomans]. Et eksempel på en responsfunktion, der udviser potens lov opførsel efterhånden som temperaturen nærmer sig det kritiske punkt, er den isotherme kompressibilitet,





Figur 2.12: DSC scan af DMPC udført af Kent Jørgensen på FKI, DTU.

$K$ :

$$K \propto (T - T^*)^{-\gamma} \quad (2.6)$$

hvor  $\gamma$  er den kritiske eksponent, der i middelfelt teori kan findes til at have værdien 1 [Yeomans].

Ved hjælp af viden om kritiske eksponenter har f.eks. [Mitaku et al., 1983] bestemt  $(T_m - T^*)$  for DPPC til at have værdien  $\sim 0.6^\circ\text{C}$ . I figur 2.12 er vist en DSC scanning kurve (Differential Scanning Calorimetry) for DMPC's specifikke varme som funktion af temperaturen. Der ses tydeligt to faseovergange; den første ved ca.  $15^\circ\text{C}$  er pretransition fra gelfasen til ripplefasen, og den anden, ved ca.  $24^\circ\text{C}$ , er main faseovergangen fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase. Hvis man kigger godt efter, er det faktisk muligt at se, hvordan kurven divergerer ved main faseovergangen, når man kommer fra høje temperaturer, men divergensen bliver afbrudt af et diskontinuert skift, når  $T_m$  nås. Kritikaliteten af main faseovergangen, dvs. hvor tæt på det pseudokritiske punkt overgangen ligger, afhænger af lipid fedthalens længde [Ipsen et al., 1990]. Jo kortere halen bliver - dvs. jo færre methylen grupper den består af - jo tættere ligger  $T_m$  på  $T^*$ , dvs. jo mere kritisk bliver overgangen. Dette vil jeg vende tilbage til i næste kapitel.

En faseovergang beskrives ofte ved hjælp af en ordensparameter for systemet. En ordensparameter kan typisk være en densitet eller densitetsforskel. Heno-



ver en kontinuert faseovergang nærmer ordensparameteren i den ene fase sig 0 kontinuert, og vil i det kritiske punkt ramme 0, for i den anden fase konstant at antage værdien 0. Lokalt vil ordensparameteren dog fluktuere voldsommere og voldsommere efterhånden som det kritiske punkt kommer nærmere. Fluktuationernes rækkevidde beskrives med en korrelations længde, som vokser, når det kritiske punkt nærmer sig, og er  $\infty$  i det kritiske punkt. F.eks. vil en kontinuert faseovergang typisk være karakteriseret ved store densitetsfluktuationer.

Udover disse mikroskopiske egenskaber, har lipide dobbeltlag også nogle makroskopiske egenskaber; de kan betragtes som tynde elastiske membraner med moduler for elasticitet, kompressibilitet, permeabilitet etc.. I næste afsnit vil jeg beskrive de elastiske egenskaber af lipide dobbeltlag.

## 2.4 Elasticitet af membraner

Jeg vil beskæftige mig med to forskellige moduli i dette afsnit; lateral kompressibilitetsmodulus,  $K_A$ , dvs. et dobbeltlags areal respons til en isotrop spænding, og elasticitetsmodulus for bøjning (også kaldet bøjningsstivhed),  $\kappa$ , dvs. et dobbeltlags krumningsradius' respons til et bøjningsmoment. Sådanne moduli kobler lipidlagenes makroskopiske respons på ydre stimuli til deres indre dynamik.

Den laterale kompressibilitetsmodulus er givet som

$$K_A = A \left( \frac{\partial \bar{T}}{\partial A} \right)_T \quad (2.7)$$

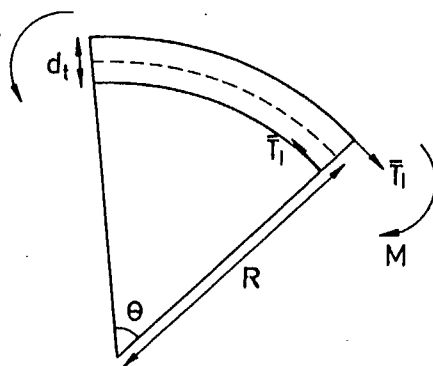
hvor  $A$  er arealet af fladen, der påvirkes og  $\bar{T}$  er en isotrop spænding (kraft pr. længdeenhed af fladens kant).

En bøjning af et dobbeltlag med bøjningsmoment  $M$  (den kraft, hvormed man bøjer dobbeltlaget; dimension Newton) giver anledning til modsatrettede spændinger i de to monolag af størrelse  $\bar{T}_1$  [Cevc and Marsh]. I figur 2.13 er vist et udsnit af et dobbeltlag, der er bøjet. Bøjningsmomentet og spændingen er koblet via tykkelsen,  $d_t$ , af lagene

$$M = \bar{T}_1 d_t \quad (2.8)$$

Hvis man betragter bøjning i kun én retning, kan spændingen skrives som

$$\bar{T}_1 = K_A \frac{\delta A}{A} = K_A \frac{d_t}{2R} \quad (2.9)$$



**Figur 2.13:** Et udsnit af et dobbeltlag bøjet i en retning.  $M$  er bøjningsmoment,  $T_1$  er spændingen i et monolag,  $R$  er krumningsradius og  $d_t$  er tykkelsen af et monolag.

hvor  $K_A$  er modulus for et monolag og  $R$  er krumningsradius (se figur 2.13). Elasticitetsmodulus er defineret som

$$\kappa = \frac{\partial M}{\partial(1/R)} \quad (2.10)$$

og bliver koblet til den laterale kompressibilitetsmodulus via

$$\kappa = K_A \frac{d_t^2}{2} \quad (2.11)$$

For flydende lipide dobbeltlag har  $K_A$  en typisk værdi på 0,14 N/m, og  $\kappa$  har dermed en typisk værdi omkring  $0.5 - 3.5 \cdot 10^{-19}$  J.

Det arbejde, der udføres ved bøjningen, svarer til den fri energi associeret til et bøjet dobbeltlag (pr. arealenhed), dvs.

$$F = \frac{1}{2} \kappa \left( \frac{1}{R} \right)^2 \quad (2.12)$$

for bøjning i én retning, og hvis endnu en retning indføres

$$F = \frac{1}{2} \kappa \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 \quad (2.13)$$

Ovenstående gælder for infinitesimal krumning af dobbeltlag, der ikke har nogen spontan krumning (f.eks. som følge af kemiske forskelle imellem de to monolag). Ligeledes er det antaget, at der er tale om lukkede membraner, der ikke ændrer topologi, således at der ikke tages hensyn til såkaldte "saddle splay" led [Gompper og Schick].

Den bøjningsmodulus, jeg her har fundet, er for et enkelt frit dobbeltlag, og jeg vil i det følgende notere den  $\kappa_0$ , idet  $\kappa$  bruges som betegnelse for bøjningsmodulus for en membran i en stak.





## 2.5 Vekselvirkninger i lipide dobbeltlag

I dette afsnit vil jeg gøre rede for de kræfter, der virker i et lipidt dobbeltlag og imellem lipide dobbeltlag i stakke (dog kun for lipider med ikke-ladede hovedgrupper). Jeg vil lægge vægt på de kræfter, der har størst indflydelse på det fænomen, jeg undersøger (anomalien i lipidernes swellingopførsel), dvs. undulationskræfter, hydreringskræfter og van der Waals kræfter.

### 2.5.1 van der Waals kræfter

Der er egentlig tre forskellige slags kræfter, der går under fællesbetegnelsen van der Waals kræfter; orienteringskræfter (dipol-dipol vekselvirkninger), induktionskræfter (dipol-induceret dipol vekselvirkninger), og dispersionskræfter (induceret dipol-induceret dipol vekselvirkninger). Jeg vil fortrinsvis skrive om den sidste slags - dispersionskræfter - som for de fleste molekyler giver det største bidrag (undtagelser er meget polære molekyler som f.eks.  $\text{H}_2\text{O}$ ) [Israelachvili].

Dispersionkræfter stammer fra molekylers øjeblikkelige dipolmoment til ethvert tidspunkt, og er derfor kræfter, der gør sig gældende for alle molekyler, også neutrale. Et ikke-polært molekyle har gennemsnitligt over tiden ikke noget dipolmoment, men til ethvert givet tidspunkt, har ethvert molekyle (og atom for den sags skyld) et endeligt dipolmoment. Det opstår på grund af molekylets ladningers øjeblikkelige positioner. Dette øjeblikkelige dipolmoment vil så inducere et dipolmoment i et nærliggende molekyle, og de to dipolmomenter vekselvirker.

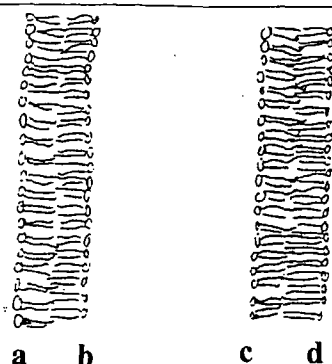
Man kan f.eks. se på et Bohratom med Bohr-radius  $a_0$  og rotationsfrekvens  $\nu$ . Det øjeblikkelige dipolmoment af et Bohratom er  $u = a_0 e$ . Energien svarende til dette dipolmoment er

$$w(r) = -\frac{u^2 \alpha_0}{(4\pi \epsilon_0)^2 r^6} \quad (2.14)$$

$$= -\frac{C}{r^6} \quad (2.15)$$

hvor  $\alpha_0$  er polarisabiliteten. van der Waals kraften imellem to vekselvirkende Bohratomer går derfor med  $r^{-7}$ . Denne approksimation kan bruges langt hen ad vejen for molekyler, der er sfæriske og små, men for store og/eller asymmetriske molekyler må man ty til lidt sværere beregninger. Desuden kan der komme retardations-effekter med i billedet, hvis den tid, det tager for det elektriske felt at udbrede sig mellem to molekyler er sammenlignelig med fluktuationstiden for det øjeblikkelige dipolmoment. van der Waals kræfterne





Figur 2.14: To vekselvirkende dobbeltlag.

er ikke additive, da det inducerede dipolmoment i et molekyle inducerer dipolmomenter i alle de omkringliggende molekyler, så man ikke simpelthen kan addere de parvise potentialer. De forskellige polarisabiliteter af molekylerne og medierne, de er omgivet af, skal der tages højde for.

Alt i alt er van der Waals kræfter ikke simple at regne på.

For multilamellare lipide vesikler er der essentielt to van der Waals kræfter, der kunne være interessante; de intermembrane og de intramembrane. Jeg vil kun se på de første, da de fortrinsvis er de interessante i forbindelse med systemets swelling opførsel. Geometrien er altså to overflader af samme slags adskilt af et vandigt medium. van der Waals kræfter imellem identiske legemer i et medium er altid attraktive [Israelachvili], så jeg kan starte med at konstatere, at der må være tale om en attraktiv kraft imellem fladerne. Hvis man antager, at der ikke er tale om retardationseffekter, at kræfterne er additive, og at antalsdensiteten af atomer (antal atomer pr. volumenenhed) i de to legemer er homogen, kan energien imellem to sådanne flader findes ved addition af parvise potentialer [Israelachvili] til at være

$$W = -\frac{A}{12\pi D^2} \quad (2.16)$$

hvor  $D$  er afstanden imellem fladerne, og  $A$  er Hamaker konstanten givet ved

$$A = \pi^2 C \rho_1 \rho_2 \quad (2.17)$$

hvor i dette tilfælde  $\rho_1$  og  $\rho_2$  (antalsdensiteten for hver af de to flader) er ens. Hvis jeg nu udvider fladerne til at være to dobbeltlag med hydrofile grupper på begge sider, får jeg tre yderligere bidrag til kraften (se figur 2.14). I ligning 2.16 er kun vekselvirkningen mellem fladerne b og c taget med. Derudover er der en vekselvirkning mellem fladerne a og c, mellem b og d og mellem a og d. Vekselvirkningerne mellem hhv. fladerne a og c og fladerne b og d er lige store og har modsat fortegn af de andre, da hovedgruppernes dipolmomenter

er modsat rettede. Den samlede van der Waals energi imellem to dobbeltlag bliver så i denne simplificerede beskrivelse [Israelachvili]

$$W = -\frac{A}{12\pi} \left( \frac{1}{D_w^2} - \frac{2}{(D_w + D_b)^2} + \frac{1}{(D_w + 2D_b)^2} \right) \quad (2.18)$$

hvor  $D_w$  nu er vandlaget tykkelse og  $D_b$  er selve dobbeltlagets tykkelse. Kraften går altså med  $r^{-3}$ , og er dermed en langtrækkende kraft. Dette kan så udvides til at omfatte flere dobbeltlag i en stak, men allerede ved afstande svarende til tre dobbeltlag er kraften aftaget til forsvindende størrelse (fuldt hydreret lipid) [Israelachvili].

Der er altså en langtrækkende attraktiv kraft imellem dobbeltlagene i en multilamellar vesikel af neutrale lipider (ovenstående er godt nok en approksimation med simple antagelser, men giver dog et rimeligt billede af van der Waals kræfterne). Denne kraft er den hovedansvarlige for, at afstanden imellem dobbeltlagene ikke bliver ved med at stige ved større vandkoncentrationer, men bliver holdt på et fast niveau (se figur 2.10).

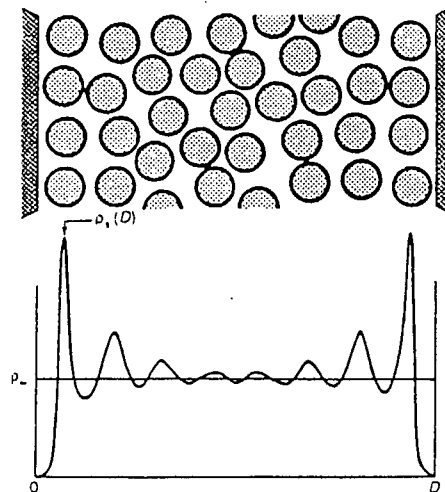
### 2.5.2 Hydreringskræfter

For kolloide systemer i opløsning taler man også om opløsningskræfter ("solvation forces"), som for vandige opløsninger også kaldes hydreringskræfter. Disse er meget korttrækkende kræfter, hvis oprindelse er ordning af solventmolekylerne omkring overflader. Efter længe at have troet, at det først og fremmest var elektrostatiske (for ladede overflader) og elektrodynamiske (van der Waals) kræfter, der styrede kolloide systemer, har man for nylig opdaget, at hydreringskræfter spiller en væsentlig rolle ved små afstande, hvor de er kraftigt dominerende [Leikin et al., 1993].

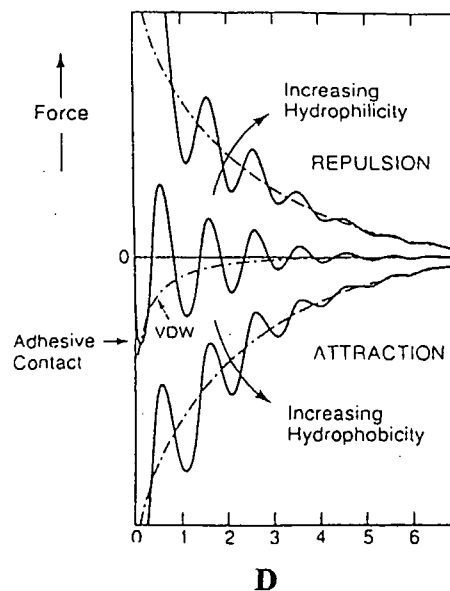
Man kan opdele hydreringskræfterne i to forskellige slags. Der er dels de oscillatoriske, der skyldes en "lag-delning" af vandmolekylerne i afgrænsede rum, f.eks. imellem to overflader, og altså fortrinsvis er geometrisk betingede (se figur 2.15). Dernæst er der de monotont (exponentielt) variende kræfter, der kan tilskrives perturbationer i solventet associeret til reorganisering af brintbindings-netværket i vand. Det er kræfter, der optræder for hydrofobe/hydrofile molekyler i vand, og perturbationerne opstår, idet vekselvirkninger mellem vand og de polære grupper opløst i vandet kan inducere positionel/orientationel ordning af vandmolekylerne [Leikin et al., 1993].

De sidstnævnte er de vigtigste, da de er dominerende, og ikke er geometriafhængige, men de samlede hydreringskræfter vil være en superposition af de to (se figur 2.16).





Figur 2.15: Den oscillerende densitetsprofil af en væske imellem to flader, der er årsag til oscillerende hydreringskræfter [Israelachvili].



Figur 2.16: Superposition af oscillerende og eksponentielt variende hydreringskræfter for henholdsvis hydrofile og hydrofobe overflader (figur modificeret fra [Israelachvili]).

Neutrale zwitterioniske lipide dobbeltlag frastøder hinanden med en exponentielt aftagende kraft:

$$P(d_w) = P_0 e^{-\frac{d_w}{\lambda}} \quad (2.19)$$

hvor  $\lambda$  er af størrelsesordenen 1 – 3 Å. Kraften er stort set uafhængig af solventets ionstyrke og komposition [Leikin et al., 1993]. Det arbejde, der skal bruges til at føre to membraner sammen, svarer til det arbejde, der skal bruges til at bringe det perturberede vand ud i bulk fasen. Denne energi er i samme størrelsesorden som brintbindingsenergien, dvs. det er en meget stor energi.

Halveringslængden,  $\lambda$ , scaler med størrelsen på solventmolekylerne, og afhænger dernæst af geometrien og naturen af lipidernes hovedgrupper (og halerne gennem deres indflydelse på geometrien).

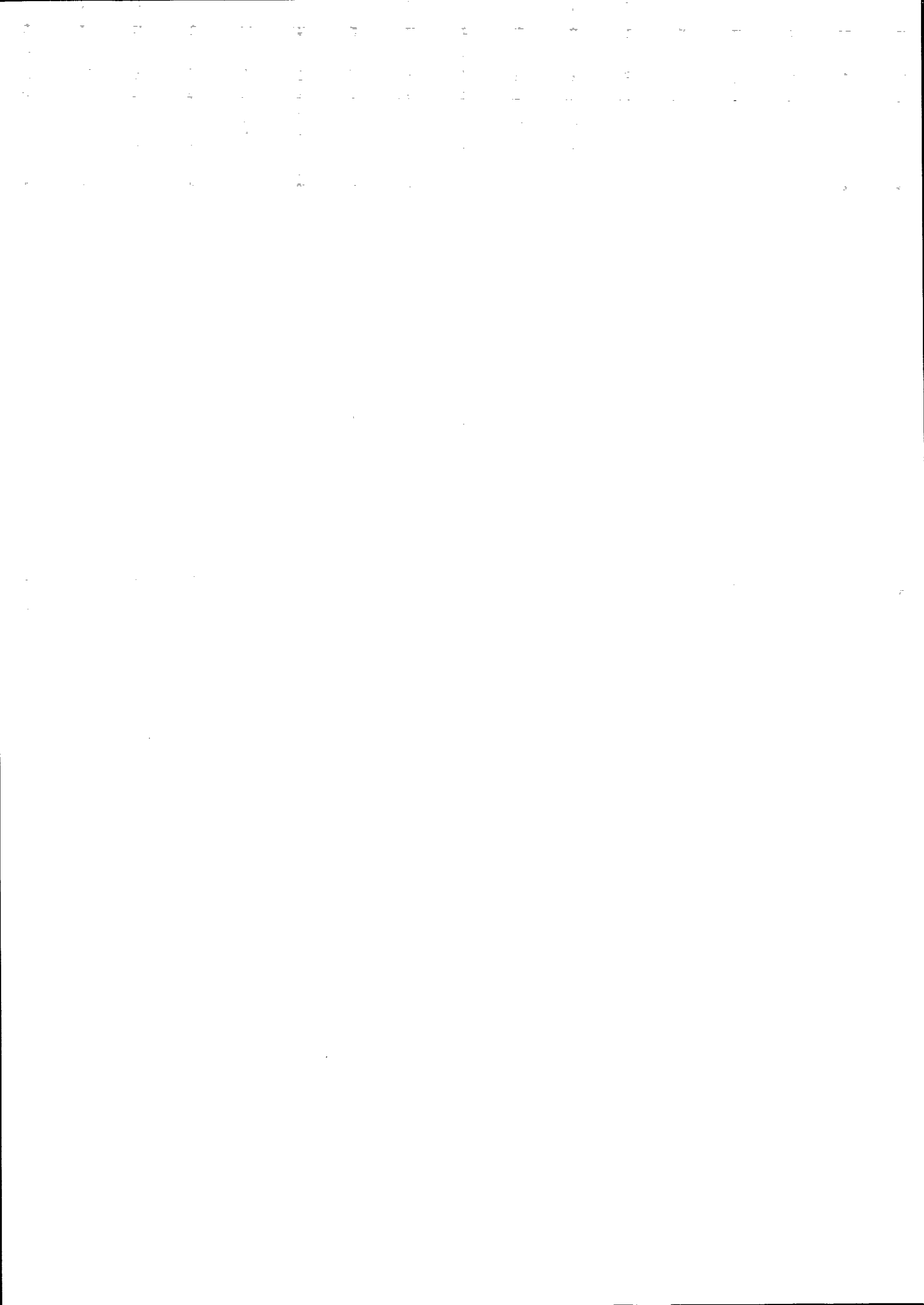
Hydreringskræfter af denne slags ses også for lipider med ladede hovedgrupper, og for andre former for hydrofobe/hydrofile materialer (f.eks. DNA og proteiner).

Hydreringskræfterne er som før nævnt dominerende for små afstande, og spiller derfor en stor rolle for fænomener, der involverer molekyllær kontakt, og sandsynligvis i forbindelse med den hydrofobiske effekt, aggregering af makromolekyler og faseovergange f.eks. i lipide dobbeltlag.

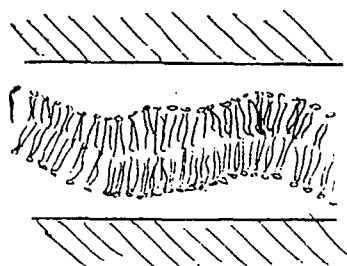
### 2.5.3 Undulationskræfter

Lipide membraner er meget bløde, og kan udvise store termiske ud-af-plan fluktuationer. Udefra set kan de betragtes som tynde elastiske flader ("sheets"), der undulerer. I stakke af membraner - f.eks. multilamellare vesikler - udgør tilstødende membraner en sterisk og entropisk hindring for en membrans undulationer. Der opstår altså en repulsiv undulationskraft af sterisk og entropisk oprindelse. Den steriske hindring består simpelthen i, at dobbeltlagenes hovedgrupper har en vis udstrækning i vandlaget, og ikke kan overlappe. Den entropiske hindring består i, at hovedgruppernes konfigurationelle muligheder bliver små, når to membraner kommer helt tæt på hinanden, og dermed giver en ufavorabel entropi.

Størrelsen af undulationskraften kan beregnes på flere måder. F.eks. kan man se et lipidt dobbeltlag i en stak som en enkelt elastisk membran, der på hver side er omgivet af stive vægge (se figur 2.17), og periodiske randbetingelser for undulationstilstandene kan antages. Et præcist udtryk for kraften er først beregnet af Helfrich i [Helfrich, 1978] på to forskellige måder, hvor den ovenfor skitserede er den ene. Jeg vil ikke gennemgå udledningen, men blot







Figur 2.17: En elastisk membran omgivet af to parallelle stive vægge.

angive resultatet. Helfrich finder, at den repulsive undulationskraft imellem dobbeltlagene i en stak må være givet ved

$$F_{hel} \approx \frac{3\pi^2}{64} \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^3} \quad (2.20)$$

hvor  $\kappa$  er elasticitetsmodulus af en membran og  $d$  er repeat distance i stakken.

Denne kraft har samme afstandsafhængighed som van der Waals kræfterne imellem dobbeltlag i en stak, og virker altså i de samme afstande (lange afstande ca. 20 – 100 Å). Undulationskraften kan nedsættes ved at udsætte membraner for spændinger ("tension"), idet undulationer derved undertrykkes. Ligeledes vil membraner med ladede hovedgrupper have små (ned til forsvindende) undulationskræfter.

Det er et præcist balanceret regnskab imellem de forskellige kræfter beskrevet ovenfor, der styrer multilamellare vesiklers swelling opførsel. Repeat distance bestemmes især af de to modsatrettede kræfter, der virker i samme afstande; van der Waals og undulationskræfter. Det er de attraktive van der Waals kræfter og de attraktive hydreringskræfter, der gør at dobbeltlagene holdes sammen i en stak; det er de repulsive undulationskræfter, der sørger for at afstanden mellem dobbeltlagene ikke bliver meget lille, og det er de repulsive hydreringskræfter, der gør at dobbeltlagene ikke klasker helt sammen for små afstande.

For de lipider, jeg beskæftiger mig med, er der ingen elektrostatiske vekselvirkninger imellem de hydrerede dobbeltlag, da hovedgrupperne ikke er ladede, men sådanne er vigtige i forbindelse med lipider med ladede hovedgrupper. At swellingopførslen for lipider med ladede hovedgrupper adskiller

sig så meget fra dem med ikke-ladede hovedgrupper er ikke mærkeligt set i dette lys (også undulationskræfterne adskiller sig for de to slags lipider).



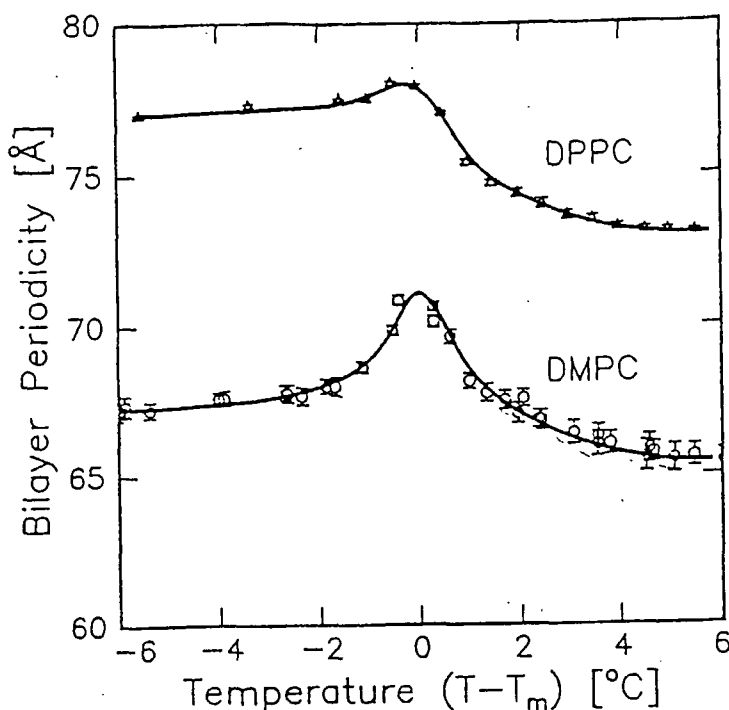
## Kapitel 3

### Anomal swelling omkring $T_m$

I dette speciale vil jeg koncentrere mig specielt om den såkaldte "main" faseovergang fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase. Specialet tager udgangspunkt i en række spredningseksperimenter foretaget af dels en forskningsgruppe fra Fysisk Kemisk Institut på DTU i vinteren/foråret 1993-94 dels en forskningsgruppe på Carnegie Mellon University, USA. Begge grupper har i eksperimenterne observeret en anomal opførsel af repeat distance i multilamellare vesikler tæt på "main" faseovergangstemperaturen  $T_m$ . Anomalien skal ses i forhold til den karakteristik, man tidligere har kendt for repeat distance, og som er vist i figur 2.11. Her ændres størrelsen af repeat distance meget pludseligt ved temperaturen for faseovergangen, som var det en første ordens smeltning af fedthalerne. Den anomale opførsel er relateret til, at "main" faseovergangen ikke er en ren første ordens faseovergang, men en svag første ordens faseovergang tæt på et kritisk punkt.

Ved hjælp af småvinkel neutronspreddning på Risø er en anomal karakteristik af repeat distance bestående i en anomal top omkring  $T_m$  fulgt af et potens lov fald med en kritisk eksponent for stigende temperatur observeret (se figur 3.1) [Hønger et al., 1994]. Gruppen har udviklet en teori, der forklarer fænomenet på basis af en renormalisering af dobbeltlagets bøjningsstivhed forårsaget af stærke densitetsfluktuationer i nærheden af faseovergangen. Denne forklaring vil jeg gøre rede for i afsnit 3.1.

Med højtopløsende røntgenspredning på CHESS, USA, er en anomal udelukkende bestående af et anomalt fald i repeat distance for temperaturer større end  $T_m$  observeret (se figur 3.2) [Zhang et al., 1995]. At faldet er anomalt vil her sige, at kurven har en stadigt større (negativ) hældning, jo tættere temperaturen kommer på  $T_m$ . Denne gruppe afviser renormaliseringsmodellen, men foreslår en forklaring på fænomenet med udgangspunkt i en kommensurat-



**Figur 3.1:** Anomali i swellingopførslen af DMPC og DPPC [Hønger et al., 1994]. Sammenlign med figur 2.11.

ikkekommensurat faseovergang. Dette vil jeg behandle i afsnit 3.2.

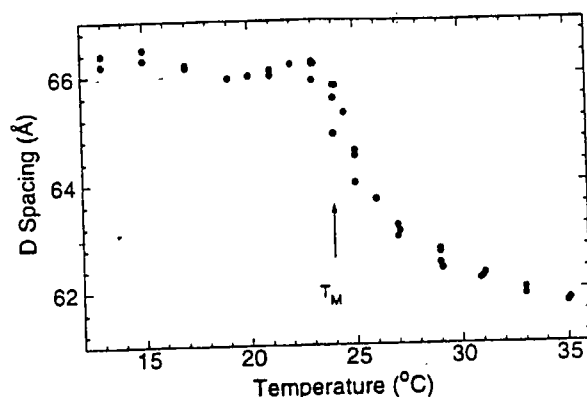
### 3.1 Anomal top

I dette afsnit gør jeg rede for den forklaring på den anomale karakteristik af repeat distance, som gives i [Hønger et al., 1994].

Hovedpunkterne i denne forklaring er, at main faseovergangens pseudokritikalitet medfører laterale densitetsfluktuationer i dobbeltlagene, som igen fører til en renormalisering af lagernes krumningselasticitet. Størrelsen af elasticitetmodulus vil således mindskes omkring  $T_m$ , hvilket igen medfører at Helfrich's repulsive undulationskraft imellem lagene øges, så afstanden imellem dobbeltlagene øges. Alt i alt er det altså faseovergangens kritiske natur, der medfører, at tykkelsen af vandlagene imellem dobbeltlagene i multilamellare vesikler bliver større omkring faseovergangen.

Som omtalt i kapitel 2 er et kritisk punkt altid karakteriseret ved kraftige fluktuationer, som kan føre til anomalier i de mekaniske responsfunktioner. Det var netop sådanne anomalier i dobbeltlags responsfunktioner, der førte til formodningen om, at main faseovergangen for de omtalte systemer sker tæt ved





Figur 3.2: Karakteristik af repeat distance for DMPC målt med højtopløsende røntgenspredning [Zhang et al., 1995].

en kritisk punkt, og således kan kaldes pseudokritisk ([Ipsen et al., 1990]). F.eks. kan modulus for den laterale kompressibilitet for dobbeltlag beskrives ved en potens lov singularitet

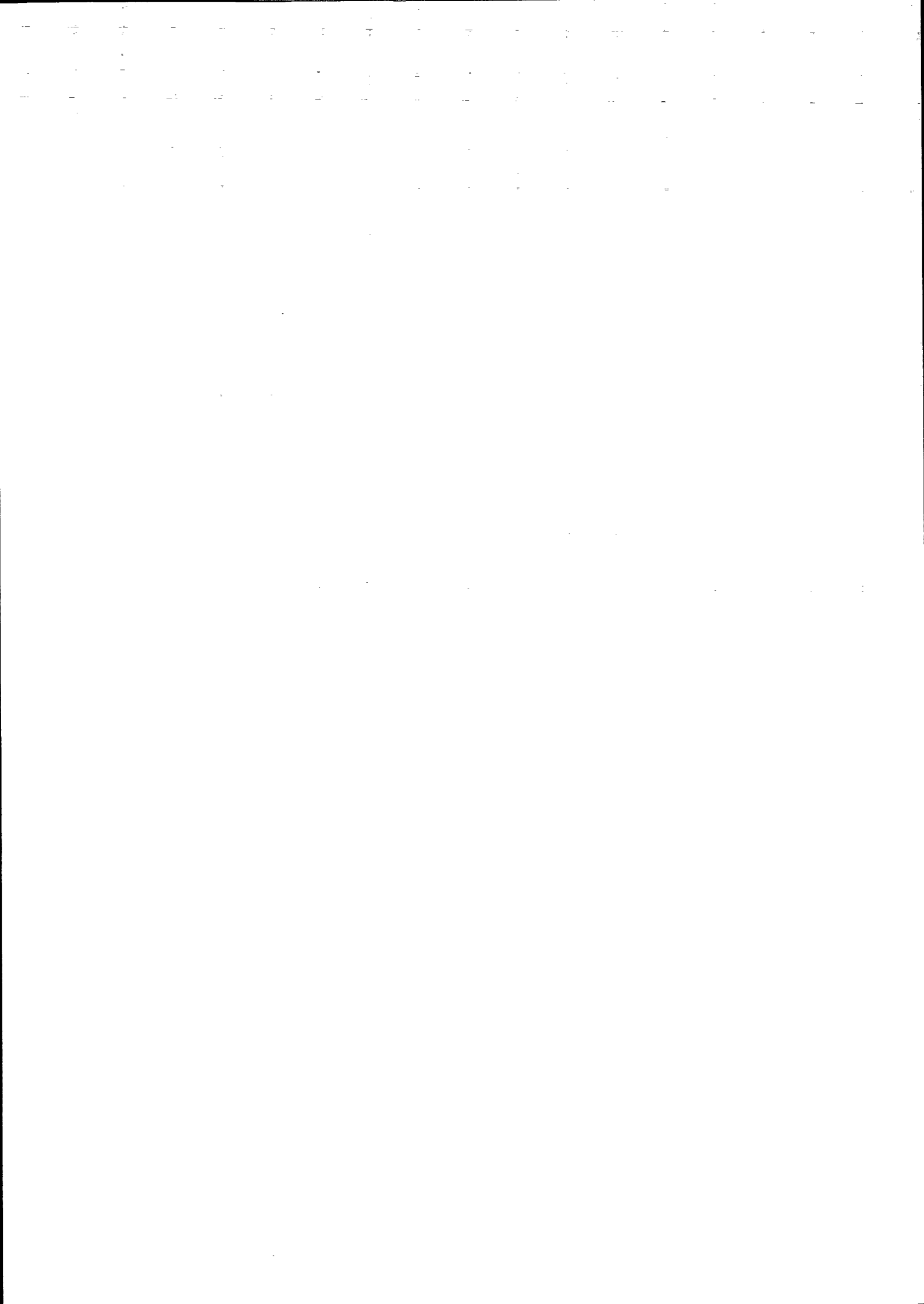
$$K(T) \propto |T - T_m| \quad (3.1)$$

hvor eksponenten er sat til 1, og  $T_m$  er indsat istedet for den pseudokritiske temperatur, da de er næsten ens [Lemmich et al., 1994]. Densitetsfluktuationerne i et dobbeltlag omkring det kritiske punkt kan beskrives ved to skalare felter; et dilationsfelt,  $\eta(\vec{x})$  og et densitetsdifferensfelt,  $\psi(\vec{x})$ . Her vil jeg kun beskæftige mig med densitetsdifferensfeltet:

$$\begin{aligned} \psi(\vec{x}) &= \phi_1(\vec{x}) - \phi_2(\vec{x}) \\ \phi_i(\vec{x}) &= \frac{(\rho_i(\vec{x}) - \rho_0)}{\rho_0} \end{aligned} \quad (3.2)$$

hvor  $\rho_0$  er middeldensiteten,  $i = 1, 2$  angiver hvert af de to monolag i et dobbeltlag og  $\vec{x}$  er en parametrisering af planets to koordinater  $x$  og  $y$ . (Dilationsfunktionen er givet ved addition af de to  $\phi$ -funktioner).

Densitetsdifferensen betragtes som en ordensparameter for systemet henover faseovergangen (forskellig fra 0 for temperaturer større end  $T_m$ , og gående mod 0 for temperaturer gående mod den pseudokritiske temperatur). Ordensparameterens værdi varierer i rummet og fluktuerer gaussisk omkring en middelværdi. At det er denne størrelse, der vælges som ordensparameter skyldes, at det netop er forskellen imellem de to monolags densitet, der kan antages at have indflydelse på dobbeltlagets krumning, samt at størrelsen





har en direkte sammenhæng med de kritiske fluktuationer i de to monolag. Den fri energi (Landau) udviklet til anden orden i ordensparameteren vil da være givet ved

$$H[\psi(\vec{x})] = \int d^2\vec{x} \left[ \frac{c}{2} (\vec{\nabla}\psi(\vec{x}))^2 + \frac{K}{2} \psi^2(\vec{x}) \right] \quad (3.3)$$

Her er  $c$  stivhedskoefficienten. Stivhedskoefficienten er relateret til fluktuationernes korrelationslængde,  $\zeta$ , i planet og kompressibilitetsmodulus ved følgende relation

$$\zeta(T) = \sqrt{\frac{c}{K(T)}} \propto |T - T_m|^{-\frac{1}{2}} \quad (3.4)$$

Derudover bidrager densitetsdifferensfeltet via en kobling til dobbeltlagets lokale middelkrumning. Det antages, at der er tale om en lineær kobling med en koblingsparameter  $r$ . Krumningen beskrives ved ud-af-plan koordinaten, dvs.  $z = z(x, y)$ .

Ialt er den fri energi givet ved funktionalet

$$H[z(\vec{x}), \psi(\vec{x})] = \int d^2\vec{x} \left[ \frac{\kappa}{2} [\nabla^2 z(\vec{x})]^2 + \frac{1}{2} [c(\vec{\nabla}\psi(\vec{x}))^2 + K\psi^2(\vec{x})] + r\psi(\vec{x})\nabla^2 z(\vec{x}) \right] \quad (3.5)$$

Det første led er Helfrich's fri energi for en membran i en stak (se afsnit 2.5.3) i en lineariseret version.

Hvis man ser på længdeskalaer meget større end  $\zeta$ , kan dobbeltlaget betragtes som værende fladt, og der vil gælde, at

$$K\psi^2(\vec{x}) \gg c(\vec{\nabla}\psi(\vec{x}))^2 \quad (3.6)$$

Det gaussisk fluktuerende densitetsdifferensfelt kan da integreres ud (i det funktionelle integral for tilstandssummen [Hønger et al., 1994]), og man får et funktional for den effektive fri energi

$$\begin{aligned} H_{eff}[z(\vec{x})] &= \frac{1}{2} \int d^2\vec{x} \left[ \kappa (\nabla^2 z(\vec{x}))^2 - \frac{r^2}{K} (\nabla^2 z(\vec{x}))^2 \right] \\ &= \frac{1}{2} \left( \kappa - \frac{r^2}{K} \right) \int d^2\vec{x} (\Delta z(\vec{x}))^2 \end{aligned} \quad (3.7)$$

Dette udtryk svarer fuldstændig til den fri energi for membraner i lameller (se afsnit 2.4), hvor  $\kappa$  blot er skiftet ud med en effektiv krumningselasticitet modulus  $\kappa_{eff}$  givet ved

$$\begin{aligned} \kappa_{eff} &= \kappa - \frac{r^2}{K} \\ \kappa_{eff} &= \kappa - \frac{r^2}{c} \zeta^2 \end{aligned} \quad (3.8)$$

Forskellen i densitetsfluktuationerne i de to monolag, der udgør et dobbeltlag i en stak medfører altså en renormalisering af krumningselasticitet modulus for hver enkelt dobbeltlag i stakken. Omkring det kritiske punkt, og dermed faseovergangstemperaturen, falder  $K$  (jvf. ligning 3.1), hvilket giver en reduktion af  $\kappa_{eff}$  i forhold til  $\kappa$ , så dobbeltlagene bliver blødere.

Krumningselasticitet modulus,  $\kappa$ , indgår som parameter i Helfrich's undulationskraft imellem membraner i stak (se afsnit 2.5.3)

$$F_{hel} \propto \frac{(k_b T)^2}{D^2 \kappa} \quad (3.9)$$

Når  $\kappa$  reduceres omkring  $T_m$ , vil den repulsive undulationskraft imellem dobbeltlagene altså forøges, hvilket igen medfører en forøgelse af afstanden,  $D$ , imellem lagene. Den repulsive undulationskraft er kun én af mange kræfter, der virker imellem lagene (jvf. afsnit 2.5), og den faktiske størrelse af afstandens forøgelse vil være et resultat af samspil imellem disse forskellige kræfter. Man kan dog sige, at jo blødere dobbeltlagene er, jo større betydning har undulationskraften imellem dem, og jo større vil forøgelsen af afstanden imellem dem være.

Koblingsparameteren,  $r$ , er ikke en kendt størrelse, og ligeledes kendes  $\kappa_0$  og  $K$  ikke tilstrækkeligt præcist til, at ligning 3.8 kan danne grundlag for en forudsigelse af absolutte størrelser.

Men forklaringsmodellen kan danne baggrund for nogle kvalitative forudsigelser i forbindelse med anomaliens størrelsesforhold. Det bør f.eks. være sådan, at jo stivere dobbeltlagene er, jo mere undertrykkes anomalien. En måde at modulere stivheden er at tilsætte membranstivende stoffer til opløsningen. I forbindelse med de eksperimenter, der ovenfor er refereret, udførtes tilsvarende målinger, hvor der var tilsat små mængder af det membranstivende stof gramicidin A. Disse målinger viste en fuldstændig undertrykkelse af swelling-anomalien, hvilket understøtter forklaringsmodellen.

En anden måde at variere stivheden af dobbeltlag er ved at variere fedthalelængden. Jo kortere fedthalerne af lipiderne er, jo tyndere er dobbeltlagene og jo blødere er dobbeltlagene. Desuden vil kritikaliteten af main faseovergangen variere med fedthale længden, således at jo kortere fedthale længden er, jo tættere er main faseovergangen på det kritiske punkt, og jo større vil fluktuationerne være. Det bør altså være sådan, at for lipider med korte fedthaler er anomalien mere udtalt end for lipider med lange fedthaler. Dette ses i artiklen [Hønger et al., 1994] at være tilfældet for DMPC og DPPC (figur 3.1). Af de to lipider har DMPC den korteste fedthale længde, dvs. den største blødhed og største kritikalitet, og udviser den største anomali. Dette understøtter igen forklaringsmodellen. I forbindelse med eksperimenter, der

har haft til formål at påvise reproducerbarheden af disse resultater, har man ikke fundet så markante anomalier som i figur 3.1. For DPPC har der ikke været nogen top at se, hvilket også er vist i figur 3.3.a. Det vil derfor ikke give nogen mening at prøve at udføre målinger med lipider med endnu længere fedthaler. Man kunne til gengæld gå ned i fedthalelængde, men ville så skulle måle på DLPC, som har en faseovergangstemperatur på ca.  $-5^\circ\text{C}$  (deutereret lipid). Dette ville give problemer, da man kommer under frysepunktstemperaturen for det overskydende vand. Desuden har DLPC en lidt anden faseopførsel for temperaturer under ripple fasen (en krystallinsk fase, som jeg ikke har omtalt,  $L_c$ , indstiller sig hurtigt).

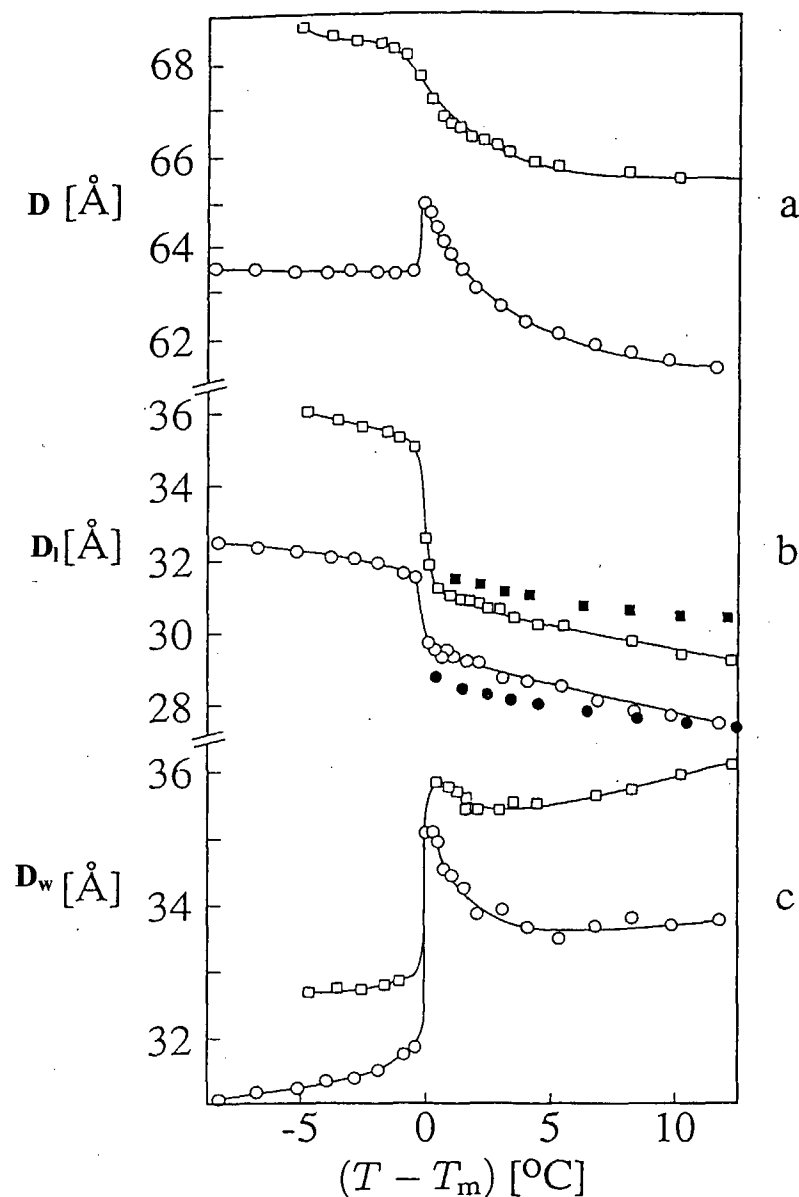
Som en yderligere understøttelse af forklaringsmodellen, udføres en mere tilbundsgående analyse af måledata [Lemmich et al., 1995], udfra en én-dimensional parakrystallinsk model, der opdeler repeat distance i vandlagstykkelse og lipidlagets tykkelse. Ifølge denne analyse sker den anomale swelling fortrinsvis i vandlagene og ikke i selve dobbeltlagene (se figur 3.3). I modellen antages det, at man kan beskrive en prøve som et antal parakrystallinske stakke uden krumning hver bestående af  $N$  perioder af fire forskellige lag; et vandlag, to lipidhoved lag og et lipidhale lag. Det antages, at hver af de fire lag har tykkelser med middelværdier, der fluktuerer gaussisk uafhængigt af hinanden, og kan beskrives med en én-dimensional elektrondensitet. Modellen er helt analog til den, der præsenteres i [Hosemann og Bagchi, kap. XII]. Modellen giver en forventningsværdi for spredningsintensiteten som funktion af elektrondensitetsprofilerne henover lipidlag og vandlag. En vesikel deles så at sige op i et antal segmenter, hvor det indenfor hvert segment antages, at krumningen er så lille, at lagene kan siges at være flade, og med  $N$  perioder i hvert segment. Det antages at de enkelte segmenter ikke vekselvirker. Tykkelsen af lipidlaget og vandlaget er frie parametre i modellen, og de værdier, som er fundet for disse parametre er angivet i figur 3.3.b og c.

Slutteligt ses der i [Lemmich et al., 1995] på hældningen af karakteristikken for repeat distance for temperaturer større end  $T_m$ . På figur 3.4 er repeat distance plottet som funktion af  $(T - T^*)^{-1}$ . Datapunkterne ligger tæt på en ret linie i dette plot, hvilket kan fortolkes som at hældningen udviser en typisk potens lov opførsel for begge lipider med kritisk eksponent  $\psi$

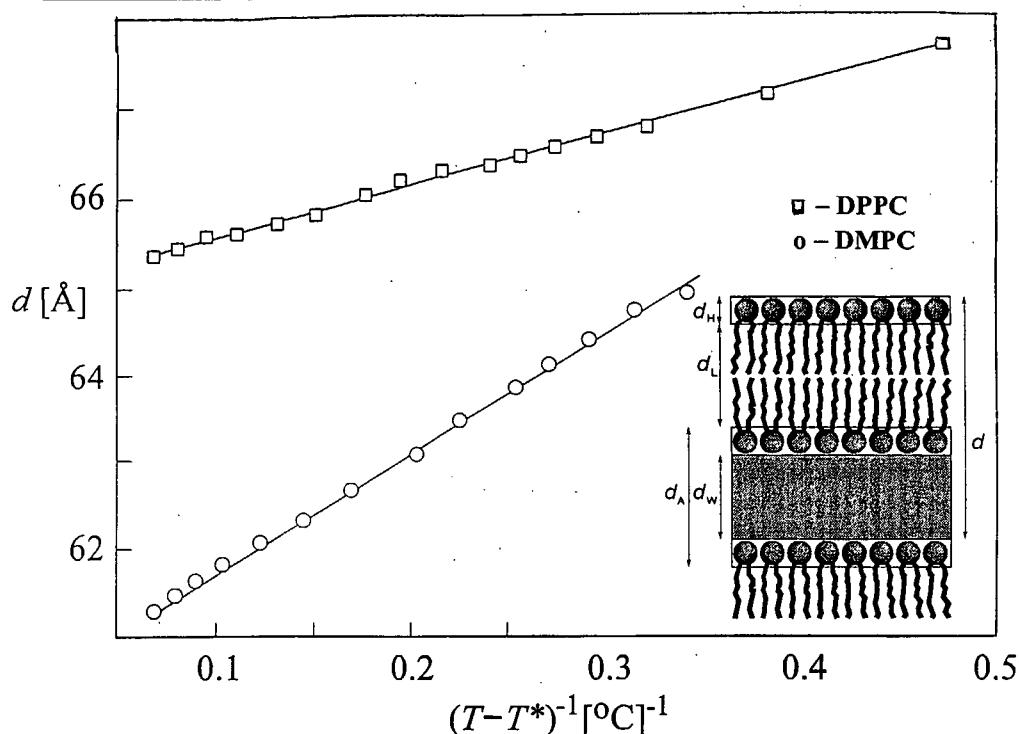
$$D(T) - D_0 \propto (T - T_c)^{-\psi} \quad (3.10)$$

med  $\psi = 1$ . I [Lemmich et al., 1995] foreslås det, at der er tale om en kritisk "unbinding" af dobbeltlagene i vesiklerne, dvs. at dobbeltlagene i den kritiske opførsel er på vej mod en fuldstændig frastøden af hinanden [Lipowsky og Leibler, 1986]. Den kritiske eksponent for denne opførsel skal netop være  $\psi = 1$ . Den pseudokritiske temperatur findes på denne måde at ligge tæt på faseovergangstemperaturen  $\frac{T_m - T_c}{T_m} \approx 10^{-2}$ .





**Figur 3.3:** Opdeling af repeat distance i hhv. vandlagenes og lipidlagenes tykkelse for DMPC og DPPC henover faseovergangen. (a) repeat distance, (b) lipidlags tykkelse, (c) vandlags tykkelse (inklusiv lipid hoveder). Firkanter angiver data for DPPC, cirkler angiver data for DMPC. Her er brugt måledata fra et andet eksperiment end i [Hønger et al., 1994]. Der ses ikke nogen anomali i repeat distance for DPPC, og for DMPC er den tydeligt mindre end i figur 3.1.



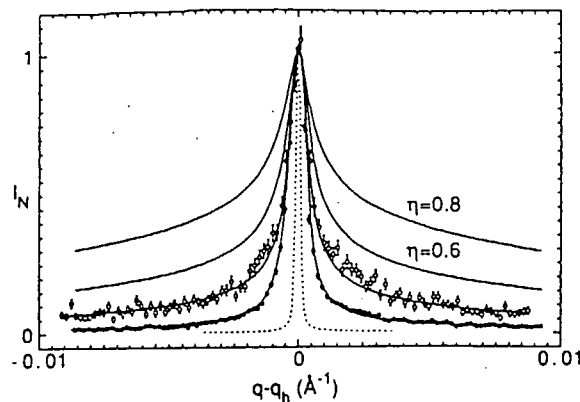
Figur 3.4: Kurverne fra figur 3.3.a plottet som repeat distance mod  $(T - T_m)^{-1}$  [Lemmich et al., 1995].

## 3.2 Anomal hældning

Tilsvarende eksperimenter med højtopløsende røntgenspredning er blevet udført af en gruppe på Carnegie Mellon University ligeledes i 1994. Den swelling opførsel, der ses i disse eksperimenter, indeholder kun en lille anomal top på ca.  $0.2\text{\AA}$ , som det ses i figur 3.2. I artiklen antages  $0.2\text{\AA}$  at være så lille et udsving, at toppen kan kaldes forsvindende. Til gengæld lægges der i artiklen [Zhang et al., 1995] vægt på kurvens form fra  $T_m$  gående mod højere temperaturer. Som det kan ses i figur 3.2 er der tale om en stadigt stigende (negativ) hældning når temperaturen nærmer sig  $T_m$  oppefra. Dette er en anomal opførsel.

I artiklen tages der afstand fra forklaringsmodellen renormalisering af krumningselasticitet modulus, idet det argumenteres, at koblingsparameteren kan være så lille, at effekten bliver negligibel. Til gengæld introduceres en model, hvor anomalien fortrinsvis skyldes anomal tilvækst i selve lipidlagets tykkelse. Denne model forklares ikke nærmere; det nævnes kun at den kan sammenlignes med en såkaldt "commensurate-incommensurate" faseovergang (beskrevet i [Nagle et al., 1989]). I stedet vies artiklen til en afvisning af renormaliseringsmodellen.





**Figur 3.5:** Formen af 1. og 2. ordens Bragg-toppene (udfyldte punkter er 1. ordens toppen og cirkler er 2. anden ordens toppen), og teoretiske kurver for Bragg-toppe med  $\eta$ -koefficienter 0.8 og 0.6. Positionen af den h'te Bragg-top angives  $q_h$  [Zhang et al., 1995].

Der tages fat i to punkter, som begge udnytter, at eksperimenterne er foretaget med højtopløsende spredning, til at afvise renormaliseringsmodellen. For begge punkter tages der udgangspunkt i de målte spektres konkrete form, så en smule kendskab til disse er nødvendig for at forstå det følgende. Jeg vil her blot nævne, at multilamellare vesikler i excess vand tilstand giver anledning til Bragg-toppe, hvor toppenes position svarer til repeat distance imellem dobbeltlagene i en vesikel. I kapitel 4 beskrives dette grundigere.

Det første punkt, der ses på, er Bragg-toppenes form (se figur 3.5). Ifølge [Caillé, 1972] vil toppenes detaljerede form afhænge af fluktuationer i vesiklerne og dermed af kompressibilitet og elasticitet moduli for dobbeltlagene. Til at beskrive formen anvendes en koefficient,  $\eta$ , som er givet ved

$$\eta = \frac{k_B T q^2}{8\pi} \frac{1}{\sqrt{BK}} \quad (3.11)$$

hvor  $B$  er kompressibilitetsmodulus for stakke af dobbeltlag og  $K$  er reduceret krumningselasticitet  $K = \kappa D$ . Bragg-toppenes form skal asymptotisk gå som  $|q - q_h|^{-1+\eta}$ , og Bragg-toppe for forskellige værdier af  $\eta$  er vist i figur 3.5. Hvis renormaliserings forklaringen er korrekt, skal både  $B$  og  $K$  falde omkring  $T_m$ , hvorved  $\eta$  vil stige. I [Zhang et al., 1995] udregnes det, at  $\eta$  ialt vil skulle stige med mindst en faktor 2 omkring  $T_m$ . Det vises ved fitning af  $\eta$  til de eksperimentelle kurver, at dette ikke er tilfældet, men at Bragg-toppene for hhv. 24.3°C (ca. overgangstemperaturen) og 33°C (langt fra overgangstemperaturen) har samme  $\eta$ -koefficient.

Det andet punkt, der ses på, er den såkaldte diskrete dobbeltlags form faktor



defineret ved

$$F(q) = \int_{-D/2}^{D/2} \rho(z) e^{iqz} dz \quad (3.12)$$

hvor  $D$  er repeat distance og  $\rho$  er elektrondensiteten i retning vinkelret på dobbeltlagene minus elektrondensiteten af vand. Da det kun er selve dobbeltlaget, der bidrager til denne størrelse, skal den kun ændre sig, hvis dobbeltlagets tykkelse (elektrondensitet) ændrer sig. I [Zhang et al., 1995] argumenteres det, at  $F(q)$  altså bør være konstant med temperaturen for et givet  $q$ , hvis renormaliseringsforklaringen er korrekt. Dette vises ikke at være tilfældet;  $F(q)$  er temperaturafhængig, således at  $D_B$  (selve dobbeltlagstykkelsen) må ændre sig med temperaturen.

Jeg mener ikke, at nogen af de to kritik-punkter er holdbare.

Det første punkt (de konstante  $\eta$ -koefficienter) kan kun være korrekt, hvis det er korrekt, at kompressibilitet og elasticitet moduli ikke ændrer sig med temperaturen (omkring faseovergangen). Til dette argumenterer [Zhang et al., 1995], at koblingsparameteren  $r$ , som introduceres i [Hønger et al., 1994], imellem densitetsfluktuationer og elasticitet, kan være negligibel. Denne koblingsparameter er dog ikke den eneste evidens for anomalier i de to moduli. I [Fernandez-Puente et al., 1994] er en anomali i krumningselasticitet målt direkte med dynamisk lysspredning. Ligeledes er kompressibiliteten med ultrasoniske eksperimenter i [Mitaku et al., 1983] målt til at have en anomali omkring faseovergangen. Hvis disse målinger er korrekte (bare én af dem), vil  $\eta$  være større omkring faseovergangen. Man må så spørge, hvorfor [Zhang et al., 1995] ikke har målt  $\eta$  til at ændre sig. Det kan f.eks. skyldes, at den faktor 2, som de har beregnet, at  $\eta$  må ændre sig for at give den anomale top, ikke er helt så stor, og at den ligger i et område, hvor forskellen er svær at se inden for den eksperimentelle statistik og opløsningsevne.

I det andet punkt (form faktor) lægges der til grund, at selve dobbeltlagene ikke ændrer tykkelse i renormaliseringsmodellen. Dette er ikke korrekt. Hvis man ser på figur 3.3 fremgår det tydeligt, at både vandlaget og dobbeltlaget ifølge den parakrystallinske model ændrer tykkelse. Det fald, der sker i repeat distance fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase sker fortrinsvis i selve selve dobbeltlagene, mens den anomale top og potens lov opførslen skyldes en stigning efterfulgt af et fald i vandlagernes tykkelse. I renormaliseringsmodellen er den diskrete dobbeltlags form faktor altså temperaturafhængig, som den også i [Zhang et al., 1995] vises at være.

Alt i alt mener jeg ikke, at de argumenter, der i denne artikel fremføres mod renormaliseringsmodellen, holder. Det er dog et faktum, at den anomale top i repeat distance ikke blev fundet med højtopløsende røntgenspredning. Der

er ingen oplysninger i artiklen om hvilket solvent, der er brugt, men jeg har fra John Nagle erfaret [Nagle], at der er tale om rent destilleret vand (i neutronspretningseksperimenterne blev brugt et solvent med både salt, buffer og bakteriozid [Hønger et al., 1994]). Der er heller ingen oplysninger om, hvordan repeat distance er aflæst på de målte spektre. Der kunne ligge nogle forklaringer på forskellene imellem de to artiklers målinger i disse aspekter.

### 3.3 Opsamling

Med småvinkel neutronspretning og højtopløsende røntgenspretning er der målt en anomal swelling opførsel af lipide dobbeltlag omkring  $T_m$ . Med neutronspretning er anomalien målt som dels en anomal hældning af repeat distance karakteristikkene for temperaturer større end  $T_m$  og dels en anomal top for temperaturer lige omkring  $T_m$ . Med røntgenspretning er anomalien kun målt som en anomal hældning for temperaturer større end  $T_m$ .

I [Hønger et al., 1994] argumenteres der for, at anomalien kan skyldes en renormalisering af krumningselastisitet omkring  $T_m$  på grund af store densitetsfluktuationer. En reduceret krumningselastisitet modulus vil medføre større repulsiv undulatorisk kraft imellem dobbeltlagene og dermed en større repeat distance. Den anomale hældning kan så være et udtryk for, at der er en kritisk unbinding af dobbeltlagene igang, der dog afbrydes af en 1. ordens faseovergang.

I [Zhang et al., 1995] argumenteres der for, at der ikke sker en reduktion af krumningselastisitet modulus af en størrelse, der kan ses på spredningsspektrene, og at der dermed ikke kan være nogen markant stigning i afstanden imellem dobbeltlagene. Den anomale hældning vil da være udtryk for en kritisk forlængelse af fedthalerne. Der bruges i det væsentlige to argumenter imod renormaliseringsmodellen, som jeg dog begge imødegår.

Formålet med dette projekt er at yderligere undersøge den anomale swelling opførsel med småvinkel røntgenspretning som supplement til de ovenfor beskrevne eksperimenter.

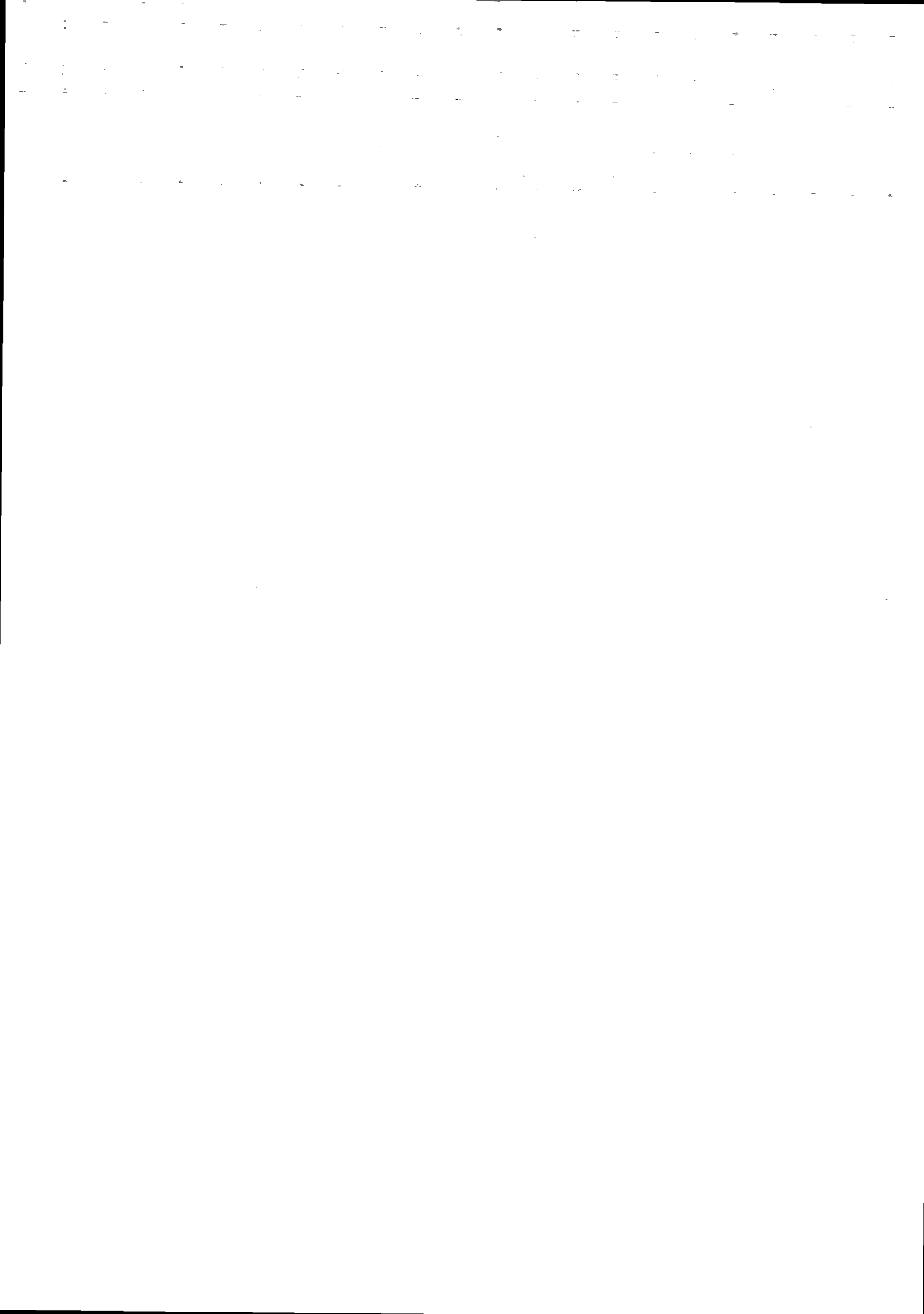
Først og fremmest vil det være interessant, om jeg overhovedet kan detektere en anomal top i repeat distance med røntgenspretning. Hvis dette er tilfældet, vil det så være interessant at konstatere, hvorvidt kædelængdeafhængigheden også kan udstrækkes til endnu kortere kæder, og det vil være interessant at forsøge at bruge modellen beskrevet i afsnit 3.1 på data målt med røntgen.

Hvis jeg ikke kan detektere en anomal top, vil det være interessant at undersøge, hvori forskellen imellem neutronspretningsmålingerne og røntgens-



predningsmålingerne ligger.

Min hypotese er, at røntgenspredningsmålingerne vil vise en anomal top samt en anomal hældning i repeat distance. Toppens størrelse vil være kædelængde afhængig, og den parakrystallinske model kan bruges på røntgenspredningsdata, og vil vise at toppen skyldes en stigning i vandlagets tykkelse.



# Kapitel 4

## Den eksperimentelle metode

Den eksperimentelle metode, jeg bruger til undersøgelse af lipiderne er småvinkel røntgenspredning med Kratky-kameraet på IMFUFA, RUC. I dette kapitel vil jeg forklare kort om principperne i røntgenspredning og specifikt principperne for Kratky-kameraets funktion. Dernæst vil jeg redegøre for, hvordan data fra eksperimenter med Kratky-kameraet analyseres.

### 4.1 Småvinkel røntgenspredning

Røntgenstråling er elektromagnetisk stråling med energi svarende til bølgelængder på ca.  $0.1 - 10 \text{ \AA}$ . Når røntgenstråling sendes ind på et stof, vekselvirker fotonerne med elektronerne i stoffet ved to processer; Compton-spredning og Thomson-spredning.

Ved Compton-spredning vekselvirker fotonerne med frie elektroner (de bundne elektroner i en prøve kan opfattes som frie på grund af de høje fotonenergier i røntgen-strålingen) som en partikel-partikel (stød) vekselvirkning. Den udgående foton har en lidt mindre energi end den indkommende, og det er derfor en inelastisk spredningsproces. Energien af den udgående foton afhænger af den indkommende foton energi og spredningsvinklen:

$$\lambda' - \lambda = \lambda_C(1 - \cos\theta) \quad (4.1)$$

hvor  $\lambda'$  er bølgelængden af den udgående foton,  $\lambda$  er bølgelængden af den indkommende foton,  $\lambda_C$  er en konstant ( $\frac{h}{mc}$ ) og  $\theta$  er spredningsvinklen. Da spredningsprocesserne må ses som enkeltstående begivenheder, dvs. de har ikke en veldefineret faserelation, og de udgående fotoner har forskellig bølgelængde, vil de dog ikke interferere. De giver således anledning til et inkoherent



bidrag til et spektrum, og ses som en jævn baggrund.

Ved Thomson-spredning vekselvirker fotonerne med frie elektroner ved at fotonernes elektromagnetiske felt accelererer elektronerne i takt med feltet, så de hver især bliver svingende dipoler. De accelererede elektroner udsender da elektromagnetiske bølger (fotoner) med en frekvens svarende til dipolbevægelsens periode, dvs. de udgående fotoner har samme energi som de indkommende. Der er altså tale om elastisk spredning. Vinkelfordelingen for udgående fotoner svarer til feltet omkring en accelereret dipol:

$$I_e = I_{ind} \left( \frac{e^2}{mc^2} \right)^2 \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2a^2} \quad (4.2)$$

hvor  $\frac{e^2}{mc^2}$  er den klassiske elektronradius,  $I_{ind}$  er den indkommende intensitet og  $a$  er afstanden imellem observationspunktet og elektronen, der spredes på. Denne formel kaldes også Thomson's spredningsformel. I småvinkelspredning er  $I_e$  næsten konstant, og sættes som regel til 1 [Glatte]. Da spredningsprocesserne sker som et resultat af den indgående bølges (beamets) acceleration af mange elektroner, dvs. der er veldefinerede faserelationer, og de udgående fotoner har samme bølgelængde, vil de interferere. Thomsons spredning er således koherent, og superpositionsprincippet for spredningsamplituderne kan anvendes. Intensitetsfunktionen,  $I(\vec{q})$ , for spredningen fra en prøve er dermed givet som kvadratet på den samlede spredningsamplitude,  $R(\vec{q})$  [Hosemann og Bagchi]:

$$I(\vec{q}) = R(\vec{q})R^*(\vec{q}) \quad (4.3)$$

hvor  $\vec{q}$  er spredningsvektoren og spredningsamplituden er defineret som fouriertransformet af elektrondensiteten igennem prøven

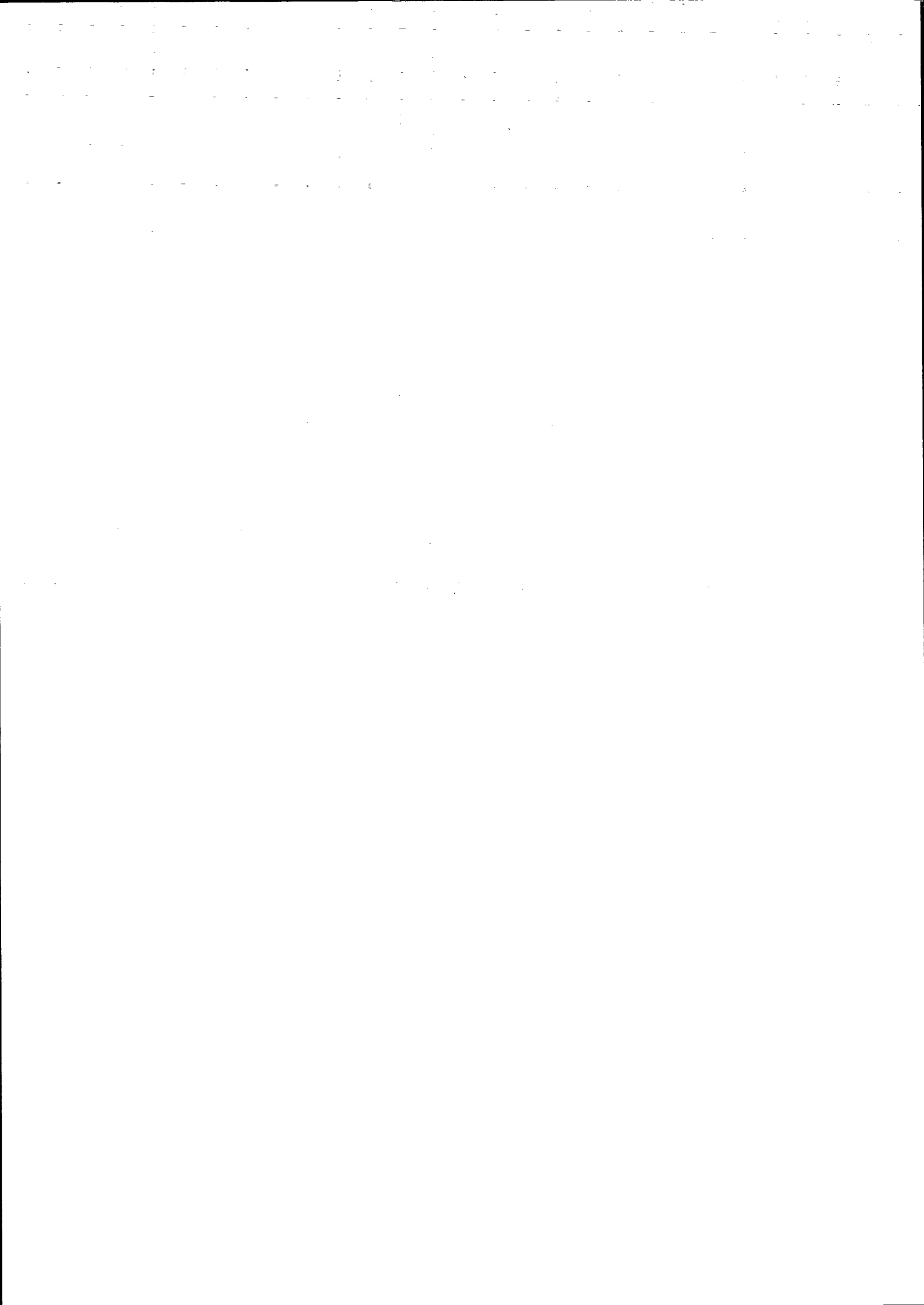
$$R(\vec{q}) = \int \rho(\vec{x}) e^{-2\pi i(\vec{q}\vec{x})} dV_x \quad (4.4)$$

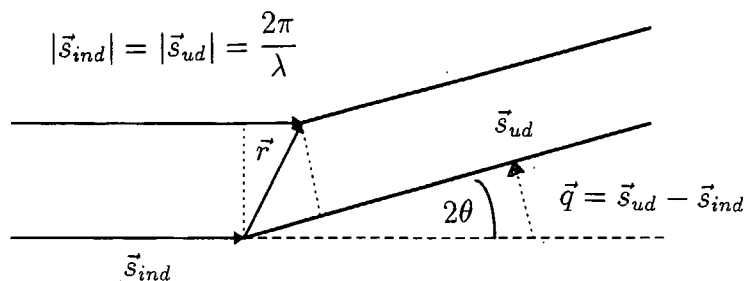
Stor intensitet i spredningen fra prøven vil ses i de retninger, hvor der sker konstruktiv interferens. En polykystal vil give anledning til konstruktiv interferens i kegler omkring det direkte beam (hvis det direkte beam er punktformet), som på en flade vinkelret på det direkte beam vil ses som ringe; såkaldte Debye-Scherrer-ringe. De vinkler, hvor der er konstruktiv interferens, er givet ved Bragg-relationen:

$$2D \sin \theta = n\lambda \quad (4.5)$$

hvor  $D$  er den karakteristiske afstand i krystallitterne,  $\theta$  er spredningsvinkel og  $n$  er et helt positivt tal, som angiver ordenen for ringene (første ring svarer







**Figur 4.1:** En spredningssituation.  $\theta$  er spredningsvinklen,  $\vec{q}$  er spredningsvektoren,  $\vec{r}$  er vektoren imellem de to partikler og  $\vec{q}\vec{r}$  er faseforskydningen imellem de udgående felter.

til  $n=1$  etc.). Længden af spredningsvektoren  $\vec{q}$  er for vinklen  $\theta$  givet ved (se spredningssituationen i figur 4.1):

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (4.6)$$

Den karakteristiske afstand i prøven kan altså findes som

$$D = \frac{2\pi n}{|\vec{q}|} \quad (4.7)$$

De multilamellare vesikler, som jeg vil undersøge, har samme egenskaber rent spredningsmæssigt som en polykrystal; der er en veldefineret karakteristisk afstand (repeat distance), og alle orienteringer af lamelnormalen er til stede. Jeg vil altså forvente at se Bragg-spredning, hvor spredningsvektoren angiver repeat distance i vesiklerne.

Med småvinkel spredning kan man se strukturer med karakteristiske længder på ca. 1-100 nm, dvs. store strukturer.

Røntgenstråler vekselvirker med elektronerne i et stof, og spredningsintensiteten afhænger lineært af antallet af elektroner i stoffet. Tunge atomer/ioner har således et større spredningstværsnit end lette. For lipider opløst i vand, befinder de tungeste ioner sig i lipid hovederne (phosphor er det tungeste stof i opløsningen, hvis man ser bort fra natrium og chlor, som kun er tilstede i små koncentrationer), så de har den største elektrondensitet, og dermed det største spredningstværsnit.



De eksperimenter, der er beskrevet i afsnit 3.1, er udført med småvinkel neutronspreddning. Ved neutronspreddning vekselvirker neutronerne med atomkernerne, og der gælder ikke en lignende lineær relation for spredningstværsnittets størrelse. Man udnytter ofte ved neutronspreddning at den tunge hydrogen-isotop deuterium har et betydeligt anderledes spredningstværsnit end hydrogen. Ved forskellige grader af deuterering af en prøve, kan man således regulere kontrasten i prøven [Mortensen, 1994]. I de SANS eksperimenter, der er beskrevet i kapitel 3, har lipidhovederne således en helt anden spredningsintensitet end resten af prøven, idet der er brugt tungt vand, og lipidhalerne er deutererede.

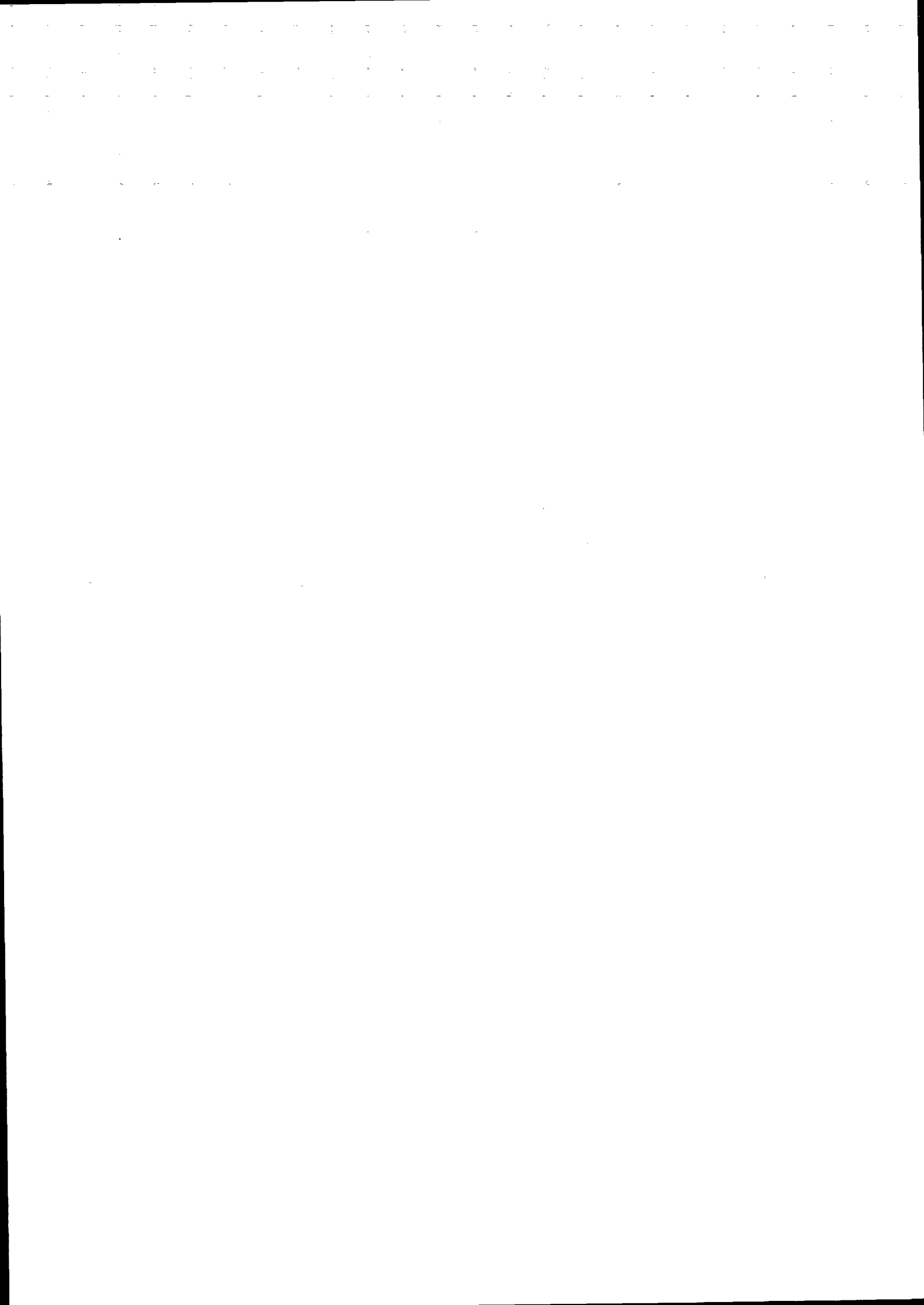
I min data-analyse får jeg kun brug for at se på simpel Bragg-diffraktion, men småvinkel spredning bruges oftest til at studere makromolekyler og kolloiders form. Her gør man brug af et lidt mere indviklet analyseapparat, hvor bl.a. formfaktor og strukturfaktor for spektrene beregnes, dog stadig med udgangspunkt i de fundamentale ligninger 4.3 og 4.4. Jeg vil ikke beskrive dette nærmere, da jeg ikke selv får brug for det, men blot henvise til [Glatte].

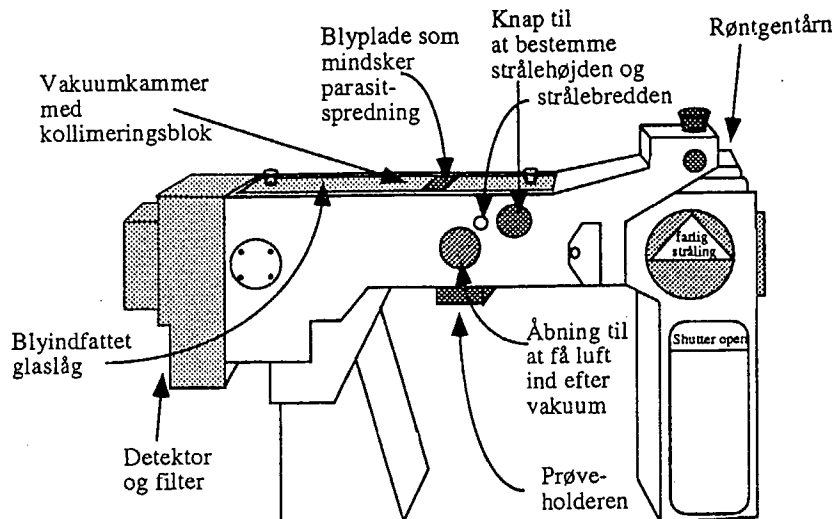
## 4.2 Kratky-kameraet

Et Kratky-kamera består i store træk af et røntgentårn, et vakuumkammer med en kollimeringsblok og en prøveholder samt en detektor med et filter, der fungerer som beamstop for det direkte beam (se figur 4.2). Røntgenstrålen genereres ved hjælp af et filament (katoden), som opvarmes ved at sende strøm igennem det. Der løsriveres så elektroner fra filamentet. Disse elektroner accelereres ved hjælp af et elektrisk felt hen til en kobberplade (anoden), som de rammer. Derved vekselvirker de med kobberets elektroner, og der udsendes fotoner med bølgelængder begrænset nedadtil af det accelererende felts størrelse, og med de for kobber karakteristiske bølgelængder fremhævet. Ved hjælp af et filter (nikkel) absorberes fotoner, så kun en smal del af disse bølgelængder -  $CuK_{\alpha}$ , dvs.  $\lambda = 1.54\text{\AA}$  - sendes videre ind til prøven.

De løsrevne fotoner fra kobberanoden udsendes i alle retninger, men kun en lille del af dem rammer igennem porten i røntgentårnet ud til prøven i vakuumkammeret. I Kratky-kameraet er porten en aflang slit (i størrelsesordenen  $cm$  og med højde i størrelsesordenen  $\mu m$ ), og beamet bliver derfor linieformet. Linieformen er valgt, for at der ikke skal blive for lille intensitet i beamet. Det havde været mest ideelt med et punktformet beam for at få gode data.

For at afgrænse beamet, så det har en veldefineret form og retning, er der umiddelbart efter røntgentårnet indført et blokkollimeringssystem. På figur



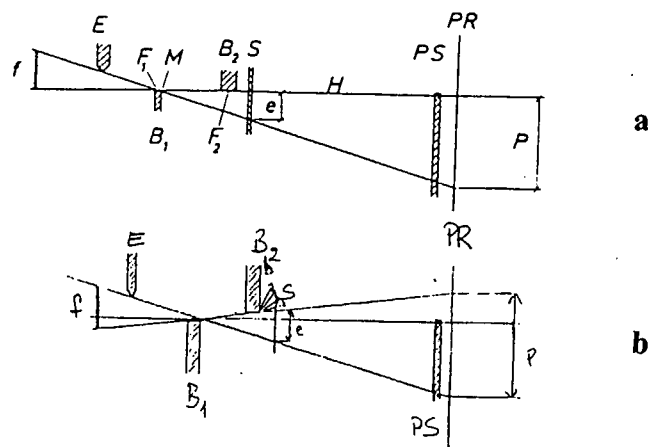


Figur 4.2: Delene i et Kratkykamera (Tegning: Stine Bøggild).

4.3.a er princippet i denne kollimering vist. Kratky-kollimeringens specielle udformning minimerer parasit-spredning, dvs. fotonanslag på detektoren, som ikke stammer fra spredning på prøven. De to blokke  $B_1$  og  $B_2$  og indgangssprækken afgrænser strålen, således at den netop rammer området  $S$ , hvor prøven befinder sig. I planet  $PR$  sidder detektoren og registrerer fotonanslag. Det direkte beam rammer i området  $p$ . Over det tværgående  $H$ -plan, vil der ideelt ikke være nogen parasitspredning, men kun spredning fra selve prøven, så det er kun her, der rent faktisk registreres. På grund af den lille parasitspredning over  $H$ -planet vil man kunne måle for meget små  $q$ -værdier, dvs. meget små vinkler.

Enderne af de to blokke  $B_1$  og  $B_2$  er i nøjagtig samme plan, og netop dette er den vigtigste del af kollimeringen. Dette ses især, hvis man prøver at forskyde de to blokke lidt i forhold til hinanden, som det er vist på figur 4.3.b. Hvis  $B_2$  hæves lidt i forhold til  $B_1$ , vil der komme sekundær spredning (parasit-) fra kanten  $b$ . Reelt vil man ikke kunne placere  $B_1$  og  $B_2$  nøjagtig i plan med hinanden, så der vil komme lidt parasitspredning over  $H$ -planet.

Selve prøven befinder sig i et aflangt horisontalt placeret glasrør med diameter 1 mm, så beamet kan ramme prøven i hele beamlængden. Detektoren består af en lodret placeret tråd i et gaskammer. Når en foton rammer gassen ioniseres den, og en kaskade af ladede partikler vil ramme tråden i en position



**Figur 4.3:** Blokkollimeringsystemet i et Kratkykamera [Glatte] (a) blokkene  $B_1$  og  $B_2$  er i samme plan; der er ingen parasit-spredning, (b)  $B_2$  er lidt hævet i forhold til  $B_1$ ; der er parasit-spredning.

bestemt af spredningsvektoren. Positionen bestemmes af anslaget på tråden, der er opdelt i 1024 kanaler, fordelt på ca. 5 cm. Man kan så omsætte kanalnummeret til  $q$ -værdi. Inden detektoren er et filter indsat. Filteret fungerer som beamstop, så det direkte beam ikke rammer selve tråden, da det har for stor intensitet. Filterets position kan varieres.

#### 4.2.1 Indstilling af kameraet

Inden en måleserie sættes i gang, skal kameraet indstilles korrekt. Det omfatter indstilling af:

- Kamerahovedets horisontale position.
- Beamets højde og længde.
- Glasrørets vertikale position.
- Hældning af glasrøret.
- Filterets position.

De fire første punkter sikrer, at der bliver størst mulig intensitet i beamet, og at det rammer prøven i hele sin længde og højde. Med filterets position kan man bestemme, hvor lave  $q$ -værdier, man måler til.





## 4.3 Behandling af data

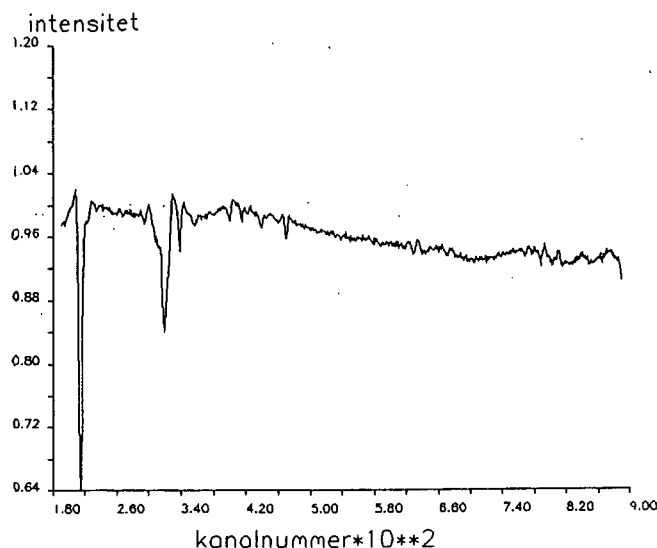
Når man får de rå data fra et eksperiment på Kratky-kameraet, skal der en del forarbejde til, før man har data, der kun afspejler den spredning, man er interesseret i; i dette tilfælde de rene Bragg-peaks, som man ville måle, hvis en punktformet røntgenstråle blev spredt på prøven.

Først og fremmest skal der tages hensyn til det baggrundsspektrum, som kameraet og prøveholderen giver anledning til. Dernæst skal der tages højde for at detektoren måske ikke er lige følsom i alle kanaler. Til sidst skal der tages højde for, at beamet ikke er punktformet, men linieformet. Dette sidste kaldes den instrumentelle desmearing. Der kan også være bidrag til denne effekt, hvis beamet har en højde, og/eller der er en spredning på fotonernes bølglængde.

### 4.3.1 Detektortrådens følsomhed

Detektortråden kan måle i et antal kanaler svarende til et antal  $q$ -værdier. Af forskellige grunde kan det være, at detektortråden ikke er lige følsom i alle kanaler, således at der for bestemte  $q$ -værdier tælles for få fotoner. Dette kan man tage højde for, hvis man kender følsomheden af tråden. Følsomheden af tråden vil f.eks. kunne findes, hvis man kan lave et spektrum, som man ved skal have samme intensitet i alle kanaler. Et sådant spektrum kan opnås ved at sætte en radioaktiv  $Fe55$  kilde ind i kameraet. Vi ved, at fotonerne fra kilden rammer jævnt i alle kanaler (når der tages højde for geometriske forskelle forårsaget af, at kilden ikke er udstrakt i hele detektortrådens længde, men nærmere er skiveformet, og placeret udfor den ene ende af tråden). Et typisk spektrum fra en brugt detektortråd er vist i figur 4.4. Der kan tages højde for følsomheden ved at normalisere et sådant spektrum for detektorens følsomhed omkring en ideel følsomhed af værdien én (se figur 4.4) og dividere det målte spektrum med det kanal for kanal. Hvis man er meget afhængig af, at detektorens følsomhed medregnes helt nøjagtigt, kan man blive nødt til at tage mere sindrige metoder i brug, men det har jeg ikke gjort. Den geometriske effekt, der ses i figur 4.4 kommer ikke til at påvirke mine resultater, da jeg skærer spektrene af ved en forholdsvis lav  $q$ -værdi, inden jeg udfører den instrumentelle desmearing. Dette kan jeg gøre, fordi de toppe, som jeg koncentrerer mig om, ligger ved lave  $q$ -værdier.



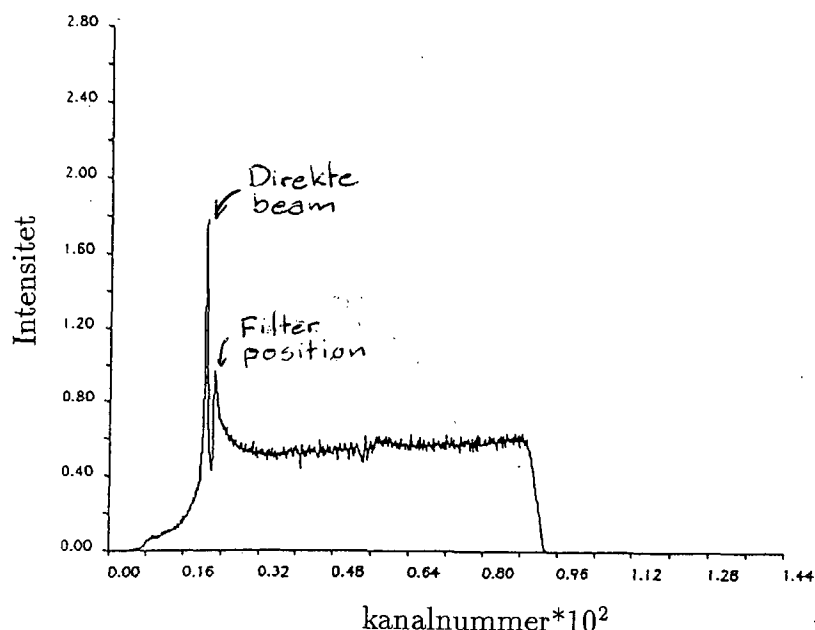


**Figur 4.4:** Et typisk spektrum genereret af en Fe55 radioaktiv kilde placeret i kameraet. Den jævnt faldende højde af spektret for højere kanaler er en geometrisk effekt. Der ses to tydelige dyk i trådens følsomhed. Det første skyldes, at det direkte beam har gået ind der; det andet, at en serie prøver har spredt specielt meget i denne vinkel.

### 4.3.2 Fratrækning af baggrund

Selvom beamet kollimeres, så det kun skulle ramme prøven, vil der være lidt spredning fra resten af kameraet, som giver en lille baggrund i et spektrum. Derudover giver glascuvetten, som prøven opbevares i og den opløsning, som prøven befinder sig i, hver især et bidrag til baggrunden. Størrelsen af denne baggrund kan man finde ved at tage et spektrum med prøveholderen fyldt med solvent. Et typisk baggrundsspektrum er vist i figur 4.5. Denne baggrund vil indgå i ethvert spektrum, som findes med kameraet, men har ikke noget med spredning fra selve prøven at gøre. Der skal derfor tages højde for det, før spektret fra prøven kan analyseres. Jeg antager, at de fire bidrag til spektret - de tre baggrundsbidrag og bidraget fra selve prøven - er additive og trækker derfor et samlet baggrundsspektrum fra det målte spektrum. Der skal dog tages højde for, at spektrene ikke har samme transmissionskoefficient, dvs. ikke absorberer lige mange fotoner. Transmissionskoefficienten,  $T$ , er et udtryk for, hvor stor en del af det direkte røntgenbeam, der når igennem kameraets kammer uden at blive absorberet eller spredt. Den kan måles som summen af intensiteterne i detektorkanalerne lige omkring det direkte beam ved cuvette (med "fyld") i prøveholderen i forhold til den samme sum, når der ikke er cuvette i prøveholderen.





**Figur 4.5:** Et typisk baggrundsspektrum for en prøveholder fyldt med en opløsning af destilleret vand (1 mM  $\text{NaN}_3$  og 10 mM  $\text{NaCl}$ ).

Intensiteten af prøven uden baggrunden kan altså findes udfra den samlede målte intensitet således:

$$I_{\text{sample}}(q) = I_{\text{total}} - I_{\text{background}} \frac{T_{\text{total}}}{T_{\text{background}}} \quad (4.8)$$

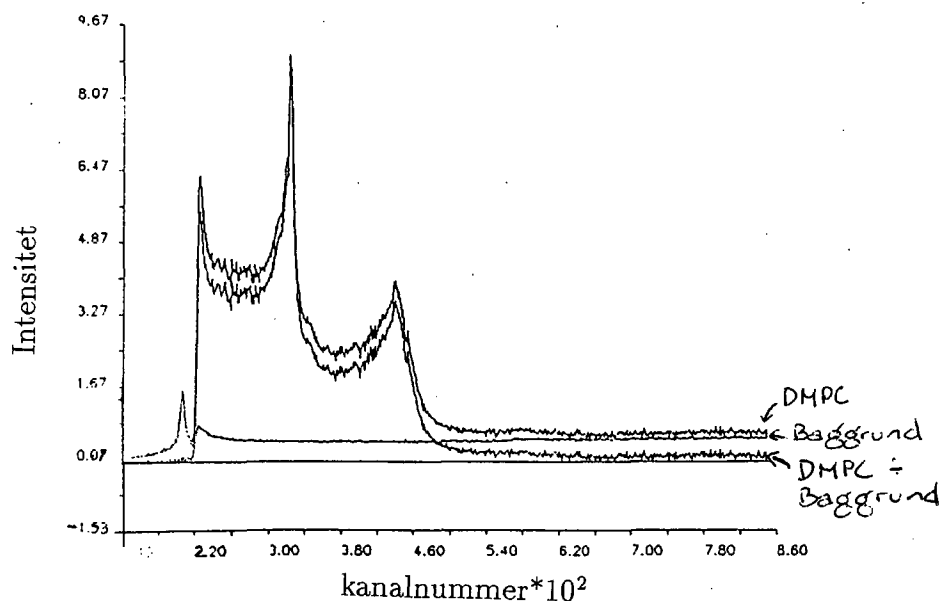
Baggrundsspektret skal naturligvis også korrigeres for detektortrådens følsomhed, før det trækkes fra det målte spektrum. I figur 4.6 ses et eksempel på et målt spektrum for DMPC, et baggrundsspektrum (begge korrigerede for detektorens følsomhed) og spektret med baggrunden fratrasket.

I praksis viser det sig desværre ofte, at den målte transmissionskoefficient ikke er anvendelig (den bliver f.eks. større end 1, eller transmissionkoefficienten for prøven bliver større end for tom cuvette). Jeg har derfor i realiteten ikke brugt ligning 4.8, men blot trukket baggrunden fra de målte spektre uden at tage højde for transmissionskoefficienter. Dette vil ikke introducere en stor fejl, da jeg hverken forventer, at mine prøver absorberer eller spredes meget.

### 4.3.3 Instrumentel desmearing

Som det kan ses i figur 4.6 udviser et målt spektrum ikke symmetriske Bragg-toppe som det burde, men er højst asymmetrisk. Det skyldes den såkaldte





Figur 4.6: Et spektrum målt på DMPC, et baggrundsspektrum og baggrundsspektret fratrasket det målte.

instrumentelle smearing.

Når kollimeringen i et røntgenkamera giver et linieformet beam, vil der komme bidrag til de målte spektre fra alle dele af beamet. De fotoner, der rammer et givet sted på detektortræden kan komme fra hele beamets længde. Dette giver anledning til en smearing af spektret. Da beamet ligeledes har en højde, vil også spredning fra de forskellige steder i beamets højde give en smearing. I Kratky-kameraet er højden dog meget mindre end længden, så højde-smearingen er meget mindre end længde-smearingen. Disse smearinger indebærer for spektre med Bragg-toppe, at toppene kommer til at fremtræde asymmetriske og forskudte. Fordelingen af fotonernes bølgelængde i beamet bevirker også en smearing, som man kan tage højde for. Dette kræver dog, at man kender fordelingen. For Kratky-kameraet er der en lille spredning af bølgelængder (nikkel-filteret er ikke en fuldkommen afskæring og  $CuK_\alpha$  toppen har en bredde), men da effekten af denne spredning kun er lille, og vi ikke kender den konkrete fordeling, udfører vi ikke desmearing for bølgelængdefordelingen. Længde- og højdesmearinger kan man tage højde for ved at kende en fordeling af fotoner fra de forskellige steder i beamet i de to dimensioner, og lade det samlede antal fotoner i en given kanal på detektoren være vægtet med denne fordeling. Med udgangspunkt i fordelingerne kan man så udføre en desmearing af spektrene, så de bliver symmetriske, og viser den ideelle

opførsel, som hvis der ikke havde været nogen smearing.

$$I_{exp}(q) = 2 \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_0^{\infty} dt Q(x) P(t) I([(m-x)^2 + t^2]^{1/2}) \quad (4.9)$$

angiver smearingen af det ideelle spektrum  $I$ , så et målt spektrum,  $I_{exp}$ , fremkommer, hvor  $Q(x)$  er højdefordelingen,  $P(t)$  er længdefordelingen og  $m$  er længden i cm på detektoren svarende til spredningsvektoren  $\vec{q}$  (se figur 4.7) [Glatte og Gruber, 1993].

Fordelingerne af fotoner fra de forskellige steder i beamet kan man finde ved at se på beam-profilen. Højde-profilen kan man f.eks. finde ved simpelthen at se på formen af det direkte beam i et baggrundsspektrum. Længde-profilen kan man finde ved at translateretektoren i beamets længdedimension, og måle antallet af fotonanslag som funktion af længden<sup>1</sup>. På figur 4.7 er vist en typisk længdeprofil. Det antages så, at de to profiler er konstante i den vinkelrette dimension (dvs. at højdeprofilen er den samme i hele længderetningen og omvendt). Vi bruger en procedure til desmearing, som er lavet af Otto Glatte; ITR (Indirect Transformation in Reciprocal Space) [Glatte og Gruber, 1993]. Et antal ( $N$ ) B-spline funktioner i  $q$ -rummet vælges til med de rette koefficienter,  $c_k$  (hvor  $k$  er en tæller for de  $N$  på hinanden følgende spline-funktioner), at skulle udgøre den desmearede intensitetsfunktion. B-spline funktionerne smeaes med de angivne profiler for beamet. De smeaede B-spline funktioner,  $\psi_k$ , fittes så til de eksperimentelle data. De koefficienter, der findes,  $c_k$ , vil også være koefficienter for de desmearede B-splines, da smearing er en lineær transformation, og man har dermed fundet en desmearet intensitetsfunktion. Fitningen foregår med en least-squares fitte-rutine

$$L = \sum_{i=1}^M \frac{(I_{exp}(h_i) - \sum_{k=1}^N c_k \psi_k(h_i))}{\sigma^2(h_i)} = minimum \quad (4.10)$$

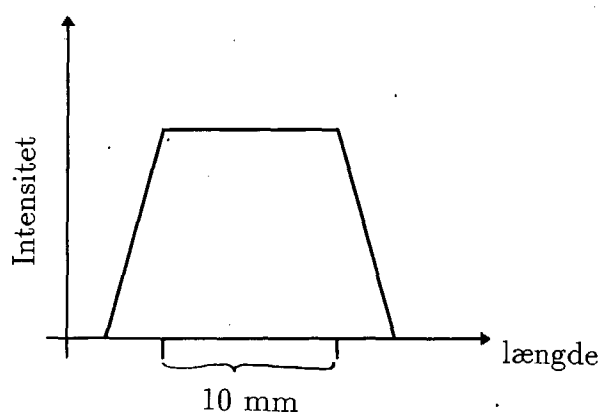
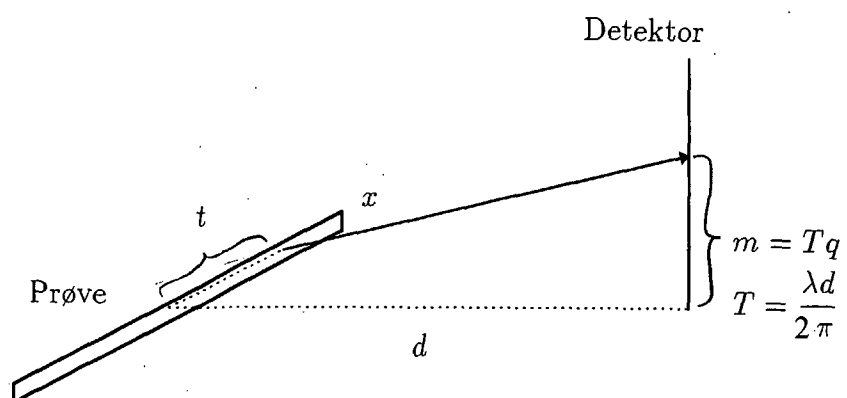
(hvor  $\sigma^2(h_i)$  er variationen i det  $i$ 'te punkts intensitet), men bl.a. på grund af den statistiske støj i de eksperimentelle data, som der skal fittes til, vil der blive stabilitetsproblemer i fitningen. Dette tages der højde for ved indførsel af en stabilitetsparameter  $\lambda$ , som angiver i hvor høj grad stabiliteten skal vægtes.

$$\begin{aligned} L + \lambda N_c &= minimum \\ N_c &= \sum_{k=1}^{N-1} (c_{k+1} - c_k)^2 \end{aligned} \quad (4.11)$$

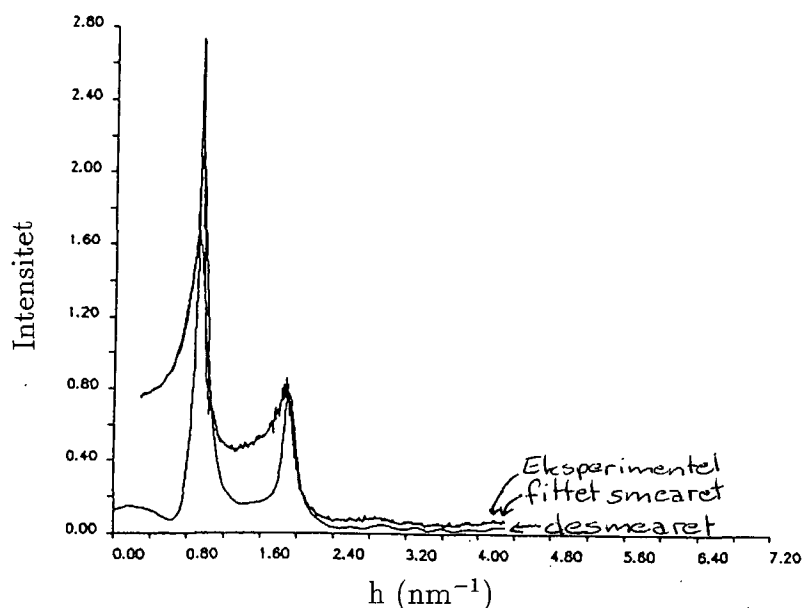
<sup>1</sup>Hvis man har mulighed for det kan man også vende detektoren, så den direkte måler i beamets længderetning. Dette fik vi mulighed for undervejs i forløbet, så jeg har brugt begge metoder.







**Figur 4.7:** En længdeprofil for et beam på 10 mm, fundet ved måling med detektoren orienteret i beamets længderetning, samt en illustrering af koordinaterne.



**Figur 4.8:** En typisk desmearing af et målt spektrum. Både den fittede smearede funktion og den desmearede funktion er vist.

$N_c$  er summen af afvigelser imellem nabospline-funktionernes koefficienter, og størrelsen af  $\lambda$  angiver dermed, hvor vigtigt det er, at denne sum er lille. Denne stabilisering kan gå godt, så længe der ikke er smalle toppe i de eksperimentelle data. Hvis dette derimod er tilfældet - som med Bragg-spektre - vil man da enten stabilisere toppene væk eller få store oscillationer imellem toppene. Dette er ikke acceptabelt, men kan løses ved at starte med at udføre en top genkendelses-procedure, og derefter sørge for, at der bliver brugt flere spline-funktioner i de områder, hvor der er toppe, end i de områder, hvor der ikke er toppe.

Da højden af beamet er så lille ( $20 - 40 \mu m$ ), og en desmearing for denne effekt ikke vil flytte toppene, vælger jeg kun at desmeare for længdefordelingen. En typisk desmearing af data med Bragg-toppe ser ud som vist i figur 4.8. Desmearingen bevirker at toppene i spektret flytter sig op til ca. 1%.

Når en konkret desmearing udføres, vælges det manuelt, hvilke toppe der skal genkendes (gennem valg af en støj-parameter), hvor mange punkter der skal medtages i hhv. top- og ikke top-områder, antallet af spline-funktioner vælges og stabilitetsparameteren vælges. Det er vigtigt, at den smearede funktion, som fittes til de eksperimentelle data i så høj grad som muligt udviser et godt fit. I denne sammenhæng vil det sige, at positionen og formen af Bragg-toppe er korrekt. Det er også vigtigt, at den desmearede funktion viser et Bragg-spektrum, der er så ideelt som muligt. Det vil i denne sammenhæng



sige, at toppene er symmetriske, at der er så mange toppe med som muligt, og at der er så få oscillationer som muligt imellem toppene.

Hvor vidt disse kriterier er opfyldt for en desmearing, vurderer man selv ved at se på de tre kurver sammen. Hvis man vurderer, at det ikke er godt nok opfyldt, prøver man at variere nogle af parametrene. Man kan argumentere, at dette ikke kan være en objektiv vurdering, og at resultaterne vil afspejle dette. Hertil er der at sige, at variationerne i Bragg-toppenes positioner (som er det eneste, jeg er interesseret i), er meget små i forhold til hele  $q$ -skalaen (i størrelsesordenen en procent højst). Jeg kan derfor ikke med det blotte øje se på et enkelt spektrum, hvor stor repeat distance i prøven er i forhold til andre spektre. Vurderingen af desmearingernes kvalitet vil være subjektiv, men kan ikke være præget af en forventning om en ønsket værdi for repeat distance for det enkelte spektrum.

## 4.4 Usikkerheder

På et målt spektrum er der tre usikkerheder; den statistiske usikkerhed på intensiteten, usikkerheden på detektorens bestemmelse af  $q$ -værdien og usikkerheden på den temperatur, spektret er målt ved. Usikkerheden på temperaturen er uddybet i kapitel 5, så den vil jeg ikke beskæftige mig mere med her. Den statistiske usikkerhed på intensiteten er givet som  $\sqrt{I}$ , men kan nedsættes ved at lave flere gentagne spektre, og bruge en gennemsnitsværdi for intensiteten. Hvis man f.eks. tager  $n$  uafhængige spektre ved samme temperatur, bliver usikkerheden på gennemsnitsspektret  $\sqrt{\frac{I}{n}}$ , hvor  $I$  er gennemsnitsintensiteten.

Når man så går igang med at operere på spektret med de ovennævnte operationer (division med et jernspektrum, fratrækning af baggrunden etc.), bliver usikkerheden for hvert operation større<sup>2</sup>. Den usikkerhed, der er på intensiteten i en kanal, kobler til usikkerheden på kanalnummer. I selve registreringen af fotonanslag er der en lille usikkerhed på kanalnummeret, idet kaskaden af ioniserede partikler har en vis udstrækning. Denne usikkerhed kender vi dog ikke, men idet der vælges 1024 kanaler på detektoren, vil jeg antage, at dette netop svarer til dens opløsningsevne (dvs. udstrækningen af en kaskade er ca.  $\frac{1}{1024}$  af detektorens længde). Idet

<sup>2</sup>Der udføres tre slags operationer; transformation af spektre med konstanter, division af spektre og subtraktion af spektre. Usikkerhederne er for disse tre operationer:

Transformation:  $aI \pm a\Delta I$

Division:  $I_3 \pm \Delta I_3$ ;  $I_3 = \frac{I_1}{I_2}$ ;  $\Delta I_3^2 = \frac{I_1^2 \Delta I_2^2 + I_2^2 \Delta I_1^2}{I_2^4}$

Subtraktion:  $I_3 \pm \Delta I_3$ ;  $I_3 = I_1 - I_2$ ;  $\Delta I_3^2 = \Delta I_1^2 + \Delta I_2^2$



der yderligere er en statistisk usikkerhed på intensiteten i to kanaler lige ved siden af hinanden, kan man ikke udelukkende ved at se på de to intensiteters størrelse bestemme, hvilken af de to kanaler, der har den absolut største intensitet (denne effekt bliver selvfølgelig formindsket jo mindre støj, der er på et spektrum). Dette er vigtigt, når man netop er ude efter positionen af toppe i spektret. I et målt spektrum må man derfor sige, at usikkerheden på positionen af toppe i spektret er  $\pm 1.5$  kanal. Når man skal omregne kanalnumre til spredningsvektorer, bruger man en q-kalibrering fundet ved hjælp af et stof med et veldefineret spektrum; f.eks. sølvbehenat. Der er naturligvis en usikkerhed på denne kalibrering, som vil optræde i omregningen fra kanalnummer til spredningsvektor. En usikkerhed på et kanalnummer svarer til en usikkerhed på  $0.00821 \pm 0.00002 \text{ nm}^{-1}$  (målt ved en q-kalibrering i august 1994).

Når man udfører desmearingen, bliver resultatet en kontinuert funktion, som er fundet med hensyntagen til den statistiske usikkerhed. Den symmetriske Bragg-top, som ses i et desmearet spektrum har et veldefineret centrum (hvis den vel at mærke er symmetrisk). Usikkerheden på positionen af denne top behøver ikke at have lige så stor usikkerhed som positionen af en top i det målte spektrum. Hvis positionen af en sådan top skal flyttes, skal hele toppen nemlig forskydes, ikke bare nogle få punkter (husk der er tale om en fuldt symmetrisk top). Aflæsningen af centrum for en sådan top gøres lettest ved at fitte en symmetrisk funktion til toppen (f.eks. en Lorentz-kurve), og få centrum ud som fitte-variabel. Som oftest vil den desmearede Bragg-top desværre ikke være helt symmetrisk, og dette introducerer en usikkerhed i aflæsningen af top-punktet. Alt i alt bliver det temmelig kompliceret at skulle regne på usikkerheden på positionen ved desmearing.

Jeg mener, at den eneste acceptable måde at kunne udtale sig om usikkerheden på positionen er ved at prøve sig frem. Da en god desmearing og et godt fit til toppen er et spørgsmål om subjektiv vurdering, må man prøve sig frem og finde ydergrænserne for desmearinger og fit, som man finder acceptable, og angive usikkerheden som den variation på positionen, der derved accepteres.

På denne måde finder jeg, at usikkerheden på aflæsningen af positionen af en top i et desmearet spektrum giver en usikkerhed i repeat distance på ca. 0.02nm for toppe, som bliver meget symmetriske, men kan blive helt op til 0.05nm (dvs. ca. 1 %) for toppe, som ikke kan blive særlig symmetriske ved desmearing.

Bestemmelse af usikkerheden på temperaturen viste sig at være et omfattende problem, som jeg vil beskrive i næste kapitel.







# Kapitel 5

## Temperatur-kalibrering

Faseovergangen fra ripple fasen til den flydende krystallinske fase er en svag første ordens faseovergang (se kapitel 2), der foregår over et temperatur-område på få tiendedele grader, og hvis placering på temperaturskalaen er veldefineret for de materialer, jeg undersøger. I mine eksperimenter ønsker jeg med så stor nøjagtighed som muligt at undersøge den temperaturafhængighed, der indgår i den anomale swelling omkring overgangstemperaturen. Det er derfor vigtigt, at jeg har stor kontrol med netop denne parameter i eksperimenterne. Det vil sige, at temperaturen er så stabil som muligt under eksperimenterne, og at jeg kender størrelsen af temperaturen med så lille usikkerhed som muligt; helst mindre end  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ .

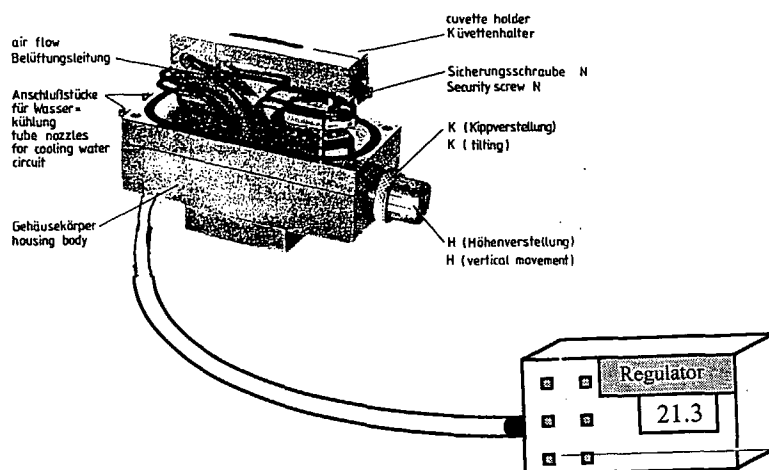
Da der ikke tidligere i laboratoriet har været arbejdet med fænomener, hvor nøjagtigheden af temperaturen er så vigtig, har der ligget en del arbejde i at opnå så stor nøjagtighed. Før jeg beskriver, hvordan jeg har grebet denne temperaturkalibrering an, vil jeg kort beskrive, hvordan temperaturreguleringen i Kratky-kameraet foregår.

### 5.1 Regulering af temperaturen

I prøveholderen til flydende prøver, sættes temperaturen ved hjælp af en temperatur-regulator, der bruger et Peltierelement placeret i prøveholder-blokken (se figur 5.1).

Peltierelementet kan både opvarme og afkøle, og kan sætte temperaturen indenfor et område fra 0 til  $70^\circ\text{C}$ .

Fra Peltierelementet i prøveholderblokken til selve prøven er der imidlertid to mellemlid; prøveholderen og glascuvetten. Hvis der er fuld termisk kontakt



Figur 5.1: Temperaturreguleringen af prøven.

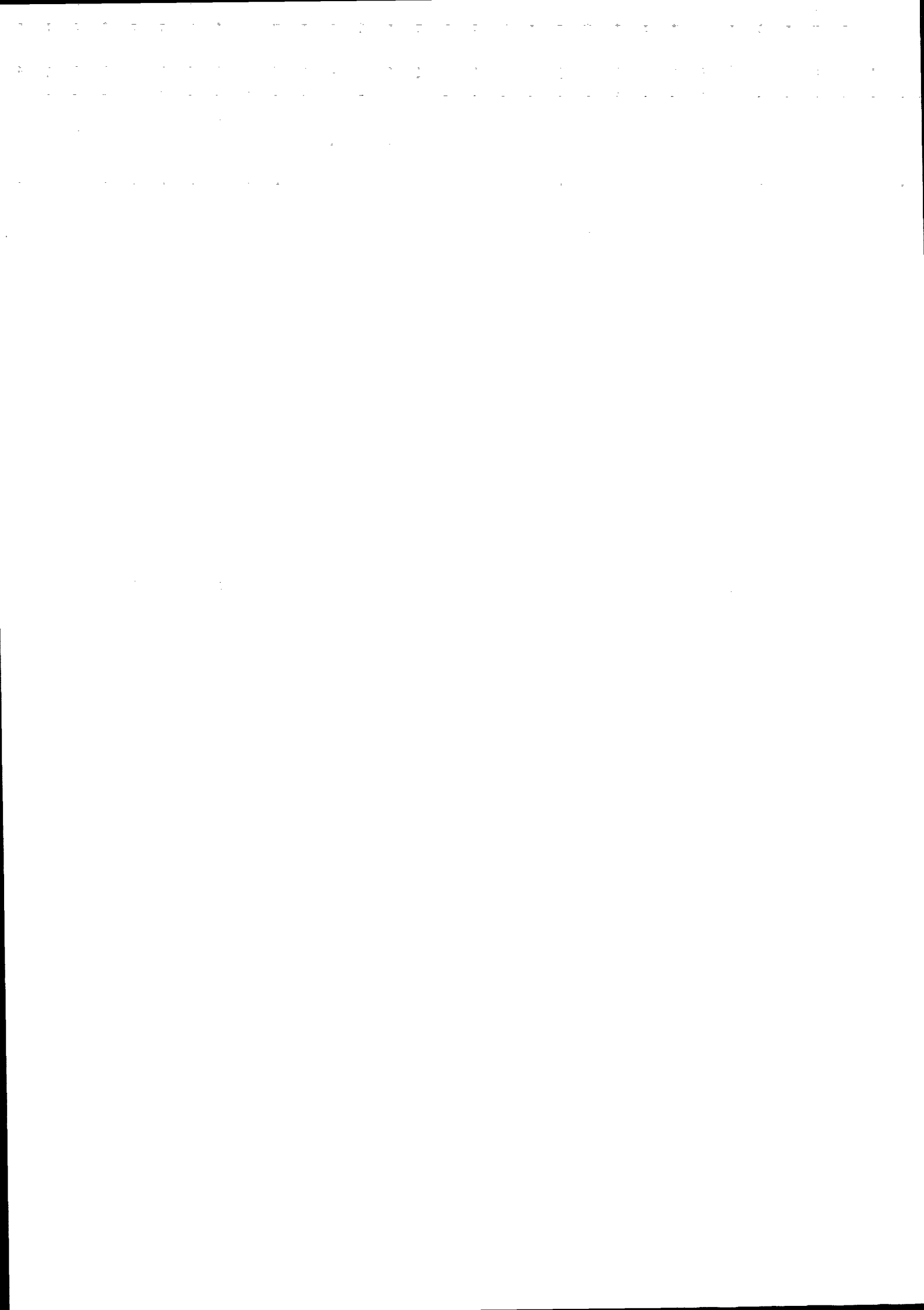
imellem hvert af disse ialt tre led, vil varmen diffundere fra prøveholderblokken til selve prøven og de vil med tiden opnå samme temperatur. Hvis der derimod ikke er god termisk kontakt imellem de tre led, vil temperaturen i prøven ikke opnå samme størrelse som temperaturen i prøveholderblokken.

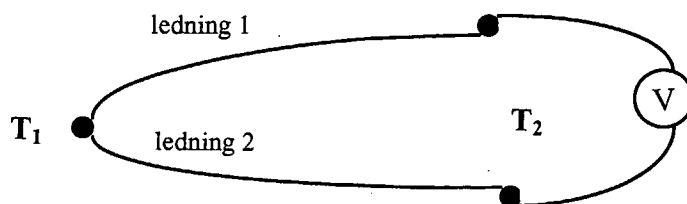
Imellem prøveholderblokken og prøveholderen er der ikke god termisk kontakt, da kontaktfladen imellem dem er lille. Prøveholderen er kun ophængt i få punkter, hvor varmeoverførslen kan ske. Imellem prøveholderen og glascuvetten er den termiske kontakt ligeledes dårlig på grund af en lille kontaktflade [Arleth et al., 1993]. Varmeoverførslen fra prøveholderblokken til selve prøven sker derfor ikke kun ved diffusion, men til dels også ved varmestråling. På grund af varmetabet til omgivelserne (som jo er et varmereservoir på ca. 20°C) vil der være en temperaturgradient fra prøveholderblokken til selve prøven (dette er behandlet mere dybtgående i [Arleth et al., 1993]). Gradienten må jeg tage højde for, når temperaturen af prøverne skal sættes i mine eksperimenter.

## 5.2 Måling af prøvens temperatur

Temperaturgradienten fra prøveholderblokken til selve prøven bestemmer jeg ved at måle temperaturen af prøven, og sammenholde den med prøveholderens temperatur ifølge regulatoren, for en række temperaturer.

Temperaturen af prøven måles direkte på glascuvetten ved hjælp af et termokoblerelement. Et termokoblerelement udnytter den termoelektriske effekt





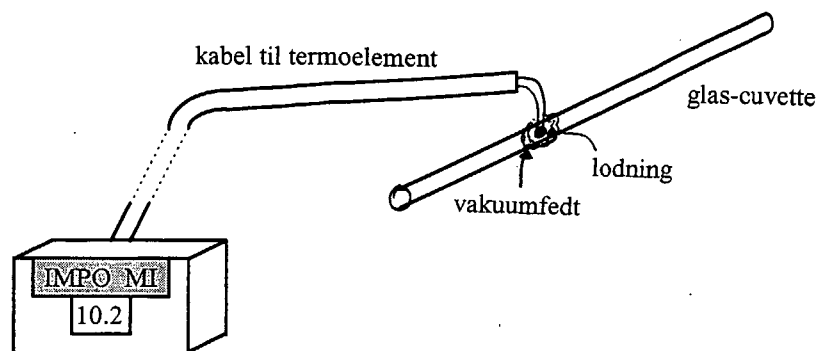
**Figur 5.2:** Den termoelektriske effekt. To ledninger af forskelligt materiale med én forbindelse ved temperaturen  $T_1$  og den anden forbindelse via et voltmeter ved temperaturen  $T_2$ .

ved temperaturgradienter i metal. Ved at lave et kredsløb af to forskellige metaller, således at den ene forbindelse befinder sig ved en temperatur  $T_1$ , og den anden (forbundet via et voltmeter) ved en temperatur  $T_2$  (se figur 5.2), vil der opstå en elektromotorisk kraft i kredsløbet, som måles i voltmeteret.

Hvis de to metaller og  $T_2$  er kendte, kan målingen af den elektromotoriske kraft entydigt omsættes til temperaturen  $T_1$ . Dette er ikke helt så simpelt som det umiddelbart lyder, idet størrelsen af den elektromotoriske kraft er meget følsom. Følgende aspekter [Schooley] kan have indflydelse:

- Endepunkterne i kredsløbet har ikke kun forskellige elektrostatiske potentialer, men også forskellige kemiske potentialer.
- Temperaturen af de to endepunkter, der er forbundet via voltmeteret skal have **nøjagtig** samme temperatur.
- Evt. skarpe kanter eller metaltræthed kan ændre kablernes karakteristika.
- Ydre kilder til den elektromotoriske kraft; f.eks. forlængerledninger, ikke-tilsigtede jordforbindelser, ydre elektromagnetiske felter etc..

Der findes instrumenter, der så vidt muligt tager højde for de af effekterne, som omhandler kemisk potentiale og referencetemperaturens nøjagtighed. Et sådant har jeg brugt (IMPO Multiinterface MI 14.36 til chromel-alumel termokoblere).



Figur 5.3: Opstilling til måling af temperaturen af prøven.

Jeg antager, at ydre kilder til den elektromotoriske kraft ikke har nogen relevans i dette tilfælde, idet jeg har været omhyggelig med kredsløbet, og antager, at røntgengeneratoren ikke genererer et felt, som har nogen betydning. Men et enkelt af punkterne har relevans, og kan få betydning for målingerne af prøvens temperatur. Det er punktet vedrørende skarpe kanter på kablerne, hvilket vil fremgå af nedenstående gennemgang af den konkrete opstilling.

Kablet til termoelementet har jeg ført igennem et dæksel ind i vakuumkammeret, hvor forbindelsespunktet mellem de to metaller (loddet sammen med almindeligt loddetin) er fastklæbet til glascuvetten med vakuumfedt. Dette er illustreret på figur 5.3.

Den termiske kontakt mellem loddepunktet af de to metaller og prøven er god, da der er en stor kontaktflade (via vakuumfedtet) og vakuumfedt er en god varmeleder. Der er dog det problem, at jeg for at få denne gode kontakt har været nødt til at bukke enden af kablet (se figur 5.3) og hage lodningen fast på cuvetten<sup>1</sup>.

For at tage højde for den fejl, som et sådant buk på kablet medfører, bør selve termoelementet kalibreres. Dette kommer jeg ind på senere i kapitlet.

<sup>1</sup>Lodningen kunne først sættes på, efter at prøveholderen var sat på plads i kameraet. Det gjorde, at det var en besværlig affære, at sætte lodningen fast, så den blev siddende. Kablernes stivhed og vakuumfedtets ringe klæbeevne gjorde det simpelthen nødvendigt at lave et buk på elementet.



## 5.3 Usikkerheder

Der er flere forskellige usikkerhedsmomenter ved denne form for temperaturkalibrering:

- Den termiske kontakt imellem loddepunktet og prøven.
- Temperaturgradienter igennem prøven langs glascuvetten.
- Rumtemperaturens indflydelse på prøvens temperatur.
- Termoelementets nøjagtighed er måske ikke optimal pga. knækket på kablet.

Disse punkter vil jeg nu behandle hver for sig.

### 5.3.1 Termisk kontakt imellem loddepunkt og prøve

I afsnit 5.2 skrev jeg kort, at den termiske kontakt kan formodes at være god. Dette begrundes jeg med, at kontaktfladen er stor, idet hele loddepunktet er i termisk kontakt med glascuvetten. Dette opnås ved at indkapsle loddepunktet i vakuumfedt som er smurt på cuvetten. Der kan dog være en usikkerhed i dette, da det er en manuel proces, hvis udfald kan blive lidt forskelligt fra gang til gang.

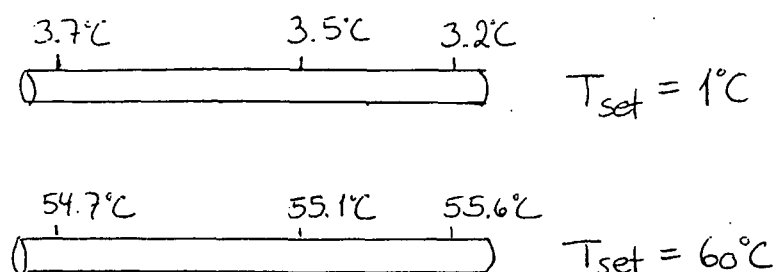
For at få en idé om, hvor stor denne usikkerhed er, har jeg taget en række små ens måleserier med loddepunktet placeret samme sted på cuvetten, men hvor det har været fjernet igen mellem hver serie. Afvigelsen imellem hver måleserie tager jeg som et mål for usikkerheden på den termiske kontakt imellem loddepunktet og prøven.

Afviselserne imellem de enkelte måleserier beløber sig højst til 0.1 grader, dvs. en usikkerhed på  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ .

### 5.3.2 Temperaturgradient i prøven

Når den termiske kontakt fra Peltier-elementet til selve prøven er dårlig, således at en del af varmeoverførslen sker ved stråling, kan man også forestille sig, at der kan være en gradient i prøven. For at fastslå, hvorvidt dette er tilfældet, måler jeg temperaturen tre forskellige steder på cuvetten. Dette gør jeg for to temperaturer ved yderpunkterne for temperaturområdet,  $1^\circ\text{C}$  og  $60^\circ\text{C}$ , da eventuelle gradienter vil være størst her.





**Figur 5.4:** Resultatet af målingerne forskellige steder på cuvetten.

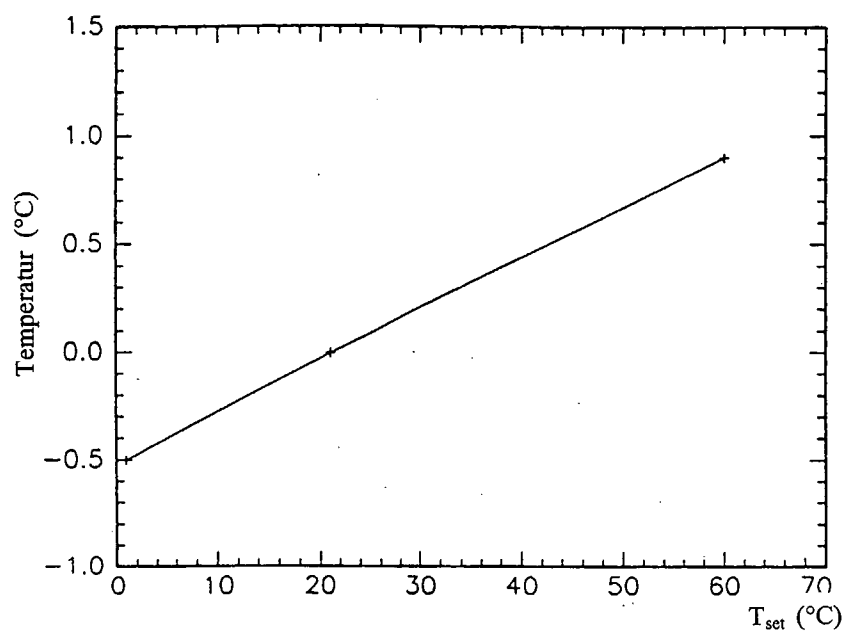
De tre punkters omtrentlige beliggenhed på cuvetten, og resultatet af målingerne er vist i figur 5.4.

Det ses, at der er rent faktisk er en gradient ved begge temperaturer, og at den ikke er negligibel. For en temperatur på  $1^{\circ}\text{C}$  er gradienten på  $0.5^{\circ}\text{C}$ , og for  $60^{\circ}\text{C}$  er den  $0.9^{\circ}\text{C}$  (med modsat fortegn).

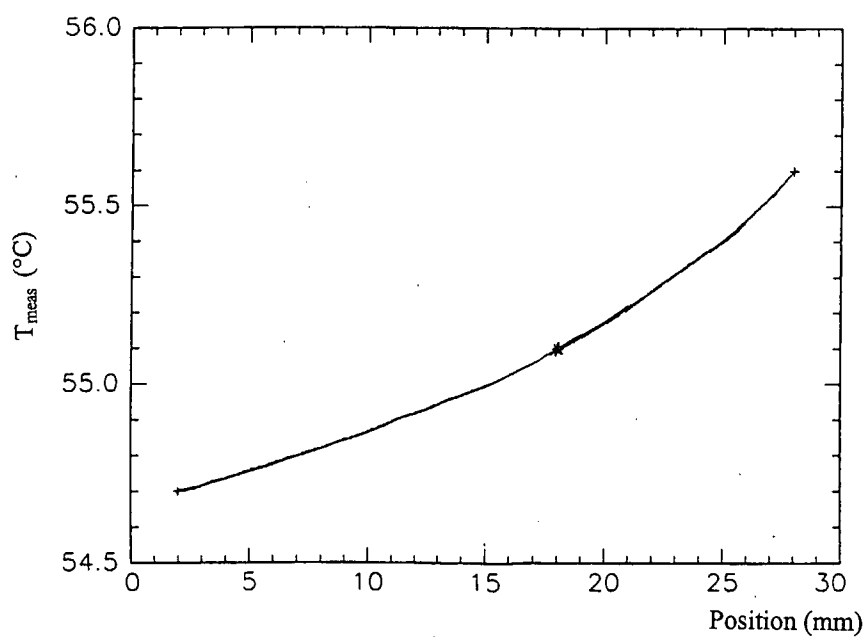
Ved at antage, at der ingen gradient er ved stuetemperatur, kan jeg approximere gradientens temperaturafhængighed med en ret linie, der skærer igennem de tre punkter. Det giver en pæn ret linie med hældning 0.025 (se figur 5.5).

En måde at tage højde for denne gradient vil være at indskrænke røntgen-beamets længde, så kun en lille del af prøven, hvor gradienten kan forventes at være lille, rammes. Jeg vil derfor se på, hvordan temperaturen afhænger af positionen på cuvetten. Dette er vist i figur 5.6.

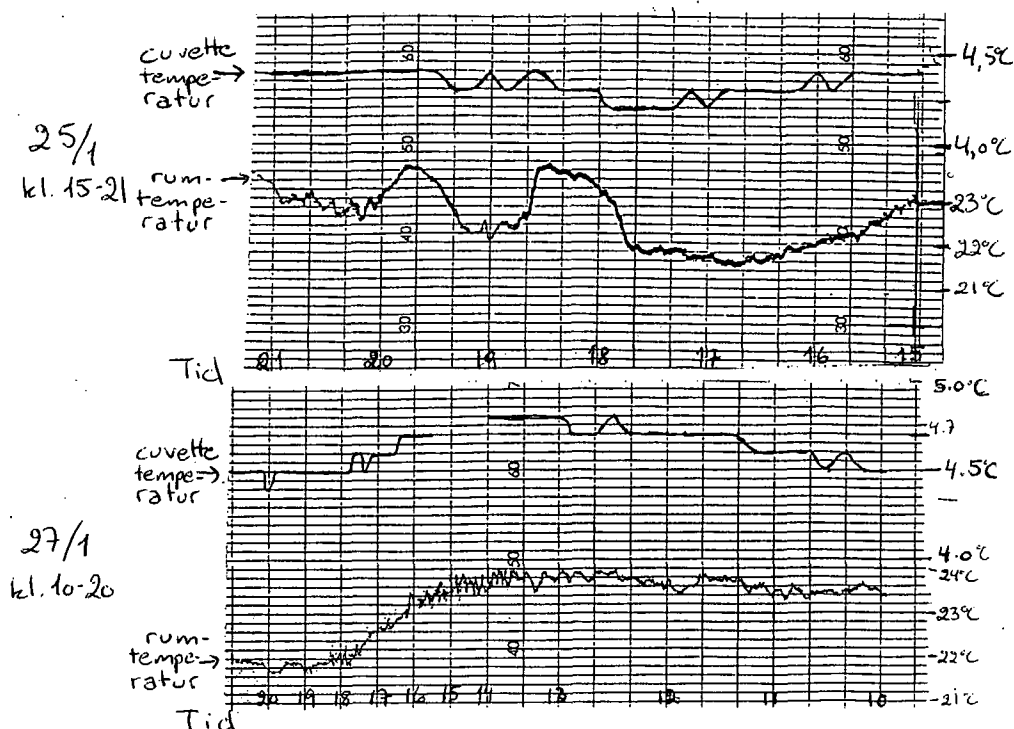
Dette kan ikke approximeres med en ret linie, men jeg har i hånden tegnet kurven, som jeg kunne formode, den vil se ud (så jævn som muligt). For at få en gradient på f.eks.  $0.1^{\circ}\text{C}$  ved en  $T_{set}$  på  $60^{\circ}\text{C}$ , skal beamet være ca. 4 mm. Dette er et forholdsvis kort beam (med hensyn til intensiteten) i forhold til en relativt stor gradient. De temperaturer, jeg skal måle ved, ligger i området  $10 - 30^{\circ}\text{C}$ , og her er gradienten over cuvetten højst  $0.3^{\circ}\text{C}$ . Beamet vil derfor kunne være betydeligt længere (8-10 mm). Man kan også skabe en termisk kontakt imellem cuvetten og prøveholderblokken i begge ender af cuvetten. Jeg vil dog ikke fortsætte med disse overvejelser, da der muligvis findes en helt anden løsning på problemet (som jeg desværre ikke selv har nået at



Figur 5.5: Temperaturforskellen imellem cuvetten's ender som funktion af temperaturen sat med Peltier-elementet,  $T_{set}$ .



Figur 5.6: Temperaturen som funktion af positionen på cuvetten.



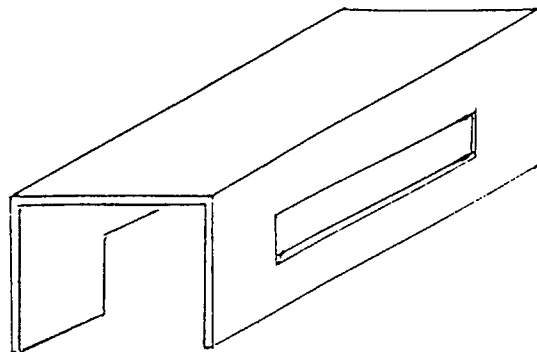
**Figur 5.7:** Sammenhørende værdier af rumtemperaturen og prøvens temperatur ( $T_{set} = 1^{\circ}\text{C}$ ) i tidsrummene hhv. 25/1 kl. 15-21 og 27/1 kl. 10-20. Bemærk at tidsskalaen går fra højre mod venstre og er forskellig på de to grafer.

benytte), og som præsenteres i afsnit 5.5.

### 5.3.3 Rumtemperaturens indflydelse

Da der ikke er nogen afskærmning af prøven og prøveholderblokken fra det omgivende rum og kameraet, kan stabiliteten af rummets temperatur have en stor indvirkning på stabiliteten af prøvens temperatur. Dette undersøger jeg ved at måle rummets temperatur over flere døgn, samtidig med at jeg jævnligt måler prøvens temperatur for en given reguleringstemperatur. Rummets temperatur måles med en termoføler placeret i umiddelbar nærhed af kameraet, og regulatoren sætter prøvens temperatur til  $1^{\circ}\text{C}$ . De sammenhørende værdier er vist for to udvalgte tidsrum, hvor svingningerne i rumtemperaturen var store, i figur 5.7.

Det ses ret tydeligt, at der er en korrelation. Ved ændringer i rumtemperaturen på et par grader, ændrer prøvens temperatur sig med op til flere tien-



Figur 5.8: Afskærmning til prøveholderblokken.

dedele grader. Udsvingene i prøvens temperatur kommer helt op på  $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$  indenfor få timer. Det er ikke acceptabelt. Der er flere mulige tilgange til at løse det problem. Da rumtemperaturen har ret store udsving ( $21$  til  $24^{\circ}\text{C}$ ), kunne man forestille sig, at det er muligt at begrænse disse udsving. Det er der gjort tiltag til, idet der er installeret en ny temperaturregulering i rummet, som holder temperaturen indenfor et område på  $0.5 - 1^{\circ}\text{C}$ , efter indsvingningstid (ca. 2 timer), når rummet er lukket. Med denne regulator ser jeg ikke udsving i prøvens temperatur større end ca.  $0.1^{\circ}\text{C}$  over de tidsrum, som en måling foregår over (dvs. 10-15 minutter). Man kan også prøve at afskærme prøven fra rummet. Dette er dog ikke nemt, da der er meget lidt plads omkring prøven og prøveholderblokken. Jeg har designet en simpel afskærmning bestående af en 1 mm tyk kobberplade beklædt med isolerende skum, som er gennemhullet, så beamet kan passere igennem (se 5.8), og som sættes ned over blokken, og er i kontakt med denne.

#### 5.3.4 Termoelementets nøjagtighed

På grund af praktiske problemer har jeg ikke kalibreret selve termokoblerelementet. Grunden til at dette havde været relevant, er det skarpe buk på ledningerne beskrevet i afsnit 5.2. Dette buk kan have den effekt, at nøjagtigheden af termokoblerelementet ikke er optimal.

I sidste afsnit fandt jeg dog, at stabiliteten af prøvens temperatur med den nye rumtemperatur regulator er helt nede på  $0.1^{\circ}\text{C}$ . Det kan ikke blive bedre indenfor den nøjagtighed IMPO MI'en kan måle med, og jeg konkluderer derfor at bukket ikke har indflydelse på stabiliteten af temperaturmålingerne. Det kan dog stadig have indflydelse på størrelsen af den absolutte temperatur, der måles med termokoblerelementet. Formodentlig vil dette dog ikke

have stor betydning i forhold til de svingninger, der på grund af omgivelsernes temperatur i forvejen findes over meget store tidsskalaer, dvs. fra uge til uge (den tidsskala, der relevant fra måleserie til måleserie).

## 5.4 Kalibreringen

Selve kalibreringen består i at tage en måleserie af sammenhørende værdier af den temperatur, som regulatoren sætter ( $T_{set}$ ), og den målte temperatur i prøven ( $T_{meas}$ ). Idet jeg antager, at reguleringen opfører sig deterministisk<sup>2</sup>, vil jeg så kunne antage, at temperaturen i prøven for en given  $T_{set}$  er givet til stor nøjagtighed ved den temperatur, jeg har målt i kalibreringsserien med de usikkerheder, jeg har fundet i de forrige afsnit. På figur 5.9 er tre af disse kalibreringsserier vist i et plot af  $T_{meas}$  versus  $T_{set}$ .

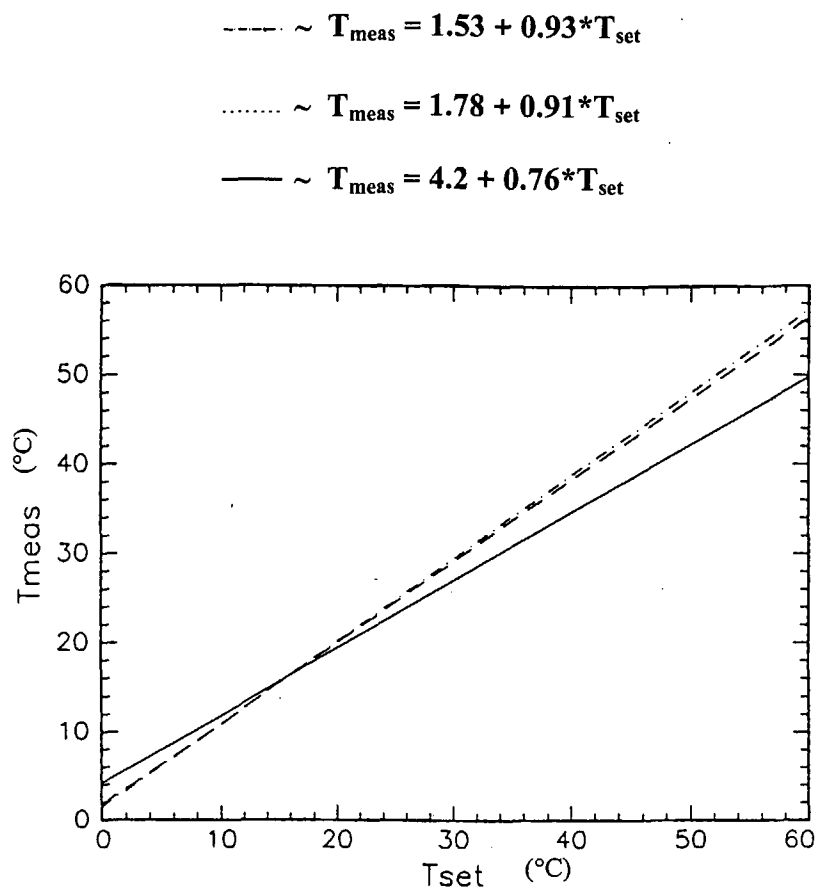
Desværre viste det sig, at kalibreringsserierne alle gav forskellige resultater, så jeg må regne med, at der er en ret stor usikkerhed (op til  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) til mit kendskab til den absolutte temperatur i prøven. Jeg vælger i praksis at benytte én af seriernes resultat som kalibrering, idet det fortrinsvis er stabiliteten af temperaturen, der er vigtig. Indenfor en måleserie - en nat - er karakteristikken for kalibreringen en pæn ret linie, så kendskab til den absolutte temperatur er blot et spørgsmål om skalering.

## 5.5 Ny prøveholder

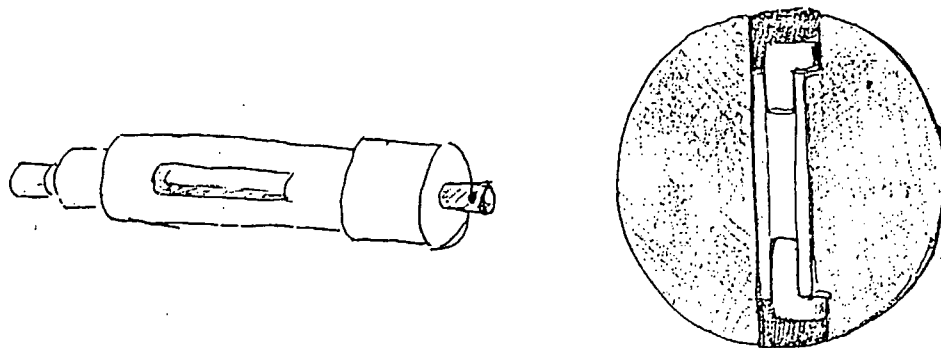
For at imødegå mange af de problemer, der er skitseret i foregående afsnit, har jeg gjort tiltag til at tage en prøveholder af et lidt andet design i brug. Designet er udført af en projektgruppe under deres projekt efteråret 1993 [Arleth et al., 1993], men blev ikke samlet og taget i brug. Princippet i prøveholderen er at bruge to flade glasplader som cuvette fremfor et langt rør som i de ovenfor skitserede prøveholdere (se figur 5.10). Dette har flere fordele:

- Røntgenbeamet skal passere lige store mængder glas ligegyldigt hvor på cuvetten, det rammer. Dette gør måledataene mere pålidelige end fra en rund cuvette, hvor glastykkelsen er afhængig af, hvor på cuvetten beamet rammer.

<sup>2</sup>Det vil her sige, at regulatoren opfører sig på samme måde, hver gang den udsættes for samme forespørgsel med samme forudsætninger. F.eks at regulatoren måler en temperatur  $t_a$ , og jeg sætter den til en anden temperatur  $t_b$ . Forudsætningerne kan naturligvis ikke være nøjagtig de samme, da f.eks. rumtemperaturen og trykket i vakuumkammeret kan variere fra eksperiment til eksperiment.



**Figur 5.9:** Plot af tre kalibreringsserier. Den med lavest hældning er fra før den nye regulator af rumtemperaturen blev indført, og før jeg begyndte at benytte afskærmning af prøven.



Figur 5.10: Den ny prøveholder set hhv. forfra og i tværsnit [Arleth et al., 1993].

- Prøven er i større kontakt med prøveholderen, som har stor berøringsflade med glaspladerne. Dette bør mindske eventuelle temperaturgradienter.
- Prøven er bedre afskærmet i forhold til omgivelserne, da der kun er et lille hul, som beamet kan passere igennem. Dette bør gøre prøvens temperatur mindre afhængig af rummets temperatur.

Holderen er lavet af kobber, og der bruges glasplader af tyndt mikroskopglas. De to plader, der adskiller glaspladerne er af messing. Til at lime delene sammen bruges en lim med stor termisk ledningsevne (Eccobond 57C).

Desværre var der mange praktiske problemer forbundet med at få prøveholderen til at fungere, og jeg måtte derfor opgive af tidsmæssige årsager undervejs. Jeg mener dog stadig, at den må udgøre et godt alternativ til de gamle prøveholdere med runde glastrør.

Et af de praktiske problemer var, at da holderen var samlet, kunne den ikke passe ind i prøveholderblokken. Dette skyldes formodentlig, at der ikke blev taget højde for en vis tolerance, da målene til holderen blev taget. Holderen måtte derfor efter sammenlimningen drejes igen, så den kunne passe ind i blokken. Dette resulterede igen i, at der kom kobberstøv på glaspladerne, så den måtte skilles ad og samles påny (hvilket var lidt af et problem, da limen var meget resistent overfor opløsningsmidler).

Et andet problem i forbindelse med denne prøveholder, som ikke er relevant for den anden, er at prøven kommer i direkte berøring med metallet både på selve holderen i de to ender og på messingpladerne. Dette er ikke hensigtsmæssigt, da der kan løsrives metalioner, der kan diffundere ud i prøven, og dermed eventuelt ændre prøvens struktur. Metallet må derfor skærmes. Dette

forsøgte jeg at gøre med en metallak - zaponlak - men det må også testes, hvorvidt lakken skærmer godt nok. Zaponlakken opløses desværre nemt, og det giver en stor begrænsning på, hvilke prøver, der kan bruges i prøveholderen, og hvordan den kan rengøres. Det er naturligvis ikke hensigtsmæssigt, og man bør overveje istedet at afskærme metallet med plastik, teflon eller glas.

Et sidste problem, jeg stødte ind i, var at den ledende lim ikke holdt vakuum godt. Man kan derfor blive nødt til enten at finde en anden ledende lim eller dække sammenlimningerne med f.eks. Araldit. Hvis man bruger den sidste løsning, skal man tage højde for det, når der tages mål til prøven.

Jeg mener, at designet alt i alt må tænkes om med specielt hensyn til de problemer, jeg har nævnt. Selve princippet med de flade glasplader skal beholdes, men sammenføjningen og materialerne må nok ændres. Dette har jeg desværre ikke haft tid til i dette projekt.

## 5.6 Opsamling

Jeg har haft mange genvordigheder i forbindelse med temperaturkalibrering, som jeg har fundet det værd at gengive her i rapporten, dels fordi det har udgjort en væsentlig del af det reelle eksperimentelle arbejde i løbet af projektet, dels for at andre eventuelt kan have glæde af mine overvejelser og tiltag.

Jeg har brugt "gamle" prøveholdere til alle målinger i dette projekt, men foreslår, at man forsøger at få nye prøveholdere som skitseret i afsnit 5.5 i produktion. Ulemperne ved de gamle prøveholdere er, at de er meget følsomme overfor rummets temperatur, og at der er en temperaturgradient fra den ene ende til den anden af en holder. Jeg har målt, hvor store disse effekter er, og tager så vidt muligt højde for dem.

Dels måler jeg rummets temperatur under alle eksperimenter (og der er installeret en bedre regulator af rumtemperaturen end tidligere), dels måler jeg om natten, dels afskærmer jeg prøveholderen fra rummet og dels afgrænser jeg beamets længde for at minimere gradienten. Temperaturen's stabilitet indenfor en måling (ca. 3-900 sekunder) er nu ca.  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  (forudsat at der ikke sker drastiske udsving i rummets temperatur). Der er en usikkerhed på mit kendskab til den absolutte temperatur på op til  $\pm 1^\circ\text{C}$ , og dette vil kunne ses på f.eks. beliggenheden af faseovergangstemperaturen på karakteristikkene for repeat distance. Indenfor en måleserie (dvs. ca. en nat) sker der ikke store udsving, så det er blot et spørgsmål om skalering.







# Kapitel 6

## Eksperimenter

I dette kapitel vil jeg præsentere de eksperimenter, som jeg har udført. Eksperimenterne er foretaget på tre forskellige lipider; DMPC, deutereret DMPC(-d54) og DC13PC. Alle lipider er købt hos Avanti Polar Lipids Inc.<sup>1</sup> og har en renhed på > 99%.

DMPC er det lipid, der i SANS eksperimenterne udviste den største anomale top (se kapitel 3). Jeg bruger derfor dette lipid til i første omgang overhovedet at detektere den anomale top med SAXS. Med SANS var det dog deutereret DMPC, der blev brugt (af hensyn til kontrasten), og jeg vælger også at undersøge deutereret DMPC med SAXS for at afgøre hvorvidt selve deutereringen kan have effekt på swellingen (kritikaliteten af main faseovergangen og/eller blødheden af dobbeltlagene kan f.eks. være forskellig). Med SANS eksperimenterne blev det vist, at en sænkning af fedthale længden fra 16 til 14 øgede størrelsen af den anomale top. Det foreslås at dette skyldes, at kritikaliteten af main faseovergangen øges, når fedthale længden sænkes [Hønger et al., 1994]. Med SANS kan man dog ikke gå længere ned end til en længde på 14<sup>2</sup>. Med SAXS er der ikke noget problem i at sænke længden yderligere til 13, dvs. DC13PC, da der ikke er behov for deuterering.

Det primære mål i dette kapitel er at prøve at trække så meget information som muligt ud af hver måleserie på baggrund af de rå data alene (jeg vil dog korrigere for baggrund og detektortrædens følsomhed først). I næste kapitel vil jeg så gå igang med desmearingen af spektrene, og se på karakteristikker for repeat distance.

Jeg vil starte med at beskrive præpareringen af prøver og overvejelser om-

---

<sup>1</sup>Alabaster, Alabama, USA

<sup>2</sup>DC13PC kan ikke umiddelbart købes deutereret (det er for kostbart), og DLPC udviser en anden faseopførsel [Cevc], [Finegold et al., 1990].



kring eksperimenternes opsætning. Derefter vil jeg på baggrund af tidligere røntgenspredningseksperimenter på lipide dobbeltlag beskrive, hvordan jeg forventer, at de målte data vil tage sig ud.

## 6.1 Præparation af prøver og eksperimentel opsætning

Alle prøver præpareres på omtrent samme måde, og jeg vil her beskrive principperne for præparering. Detaljerne for de enkelte eksperimenter er angivet i tabeller i de respektive afsnit.

Lipiderne opbevares på pulverform i dybfryseren, og de tøs langsomt op før præparering. Der afvejes ca. 45-50 mg lipid, som opløses i 0.2 ml solvent. Dette svarer til en vægtprocent på ca. 17-20% lipid. Solventet består af millipore vand, som er kogt, og tilsat salt og bakteriozid (10 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>). Valget af solvent er foretaget efter vejledning af Kent Jørgensen, FKI, DTU, og det er ikke det samme solvent, som er benyttet i nogen af eksperimenterne refereret i kapitel 3. Ifølge Kent Jørgensen er det en fordel, at der er så få fremmede molekyler som muligt i solventet, men at det erfaringsmæssigt har vist sig, at der bør være et minimum af netop salt og bakteriozid. Jeg har ikke fundet nogen systematisk undersøgelse af virkninger af tilsætninger til solventet, men gentagne neutronspreddningseksperimenter foretaget af gruppen på DTU viser, at f.eks. variationer i saltkoncentrationen indenfor området 0-150 mM ikke har nogen påvislig effekt på anomalien.

Opløsningen nedsænkes i et vandbad ca. 15 – 20°C over lipidets main faseovergangstemperatur (for DMPC f.eks. ca. 40°C). Ved denne temperatur holdes prøven i ca. 2 timer, mens den rystes jævnligt med 10-15 minutters mellemrum. Herefter køler opløsningen langsomt af til stuetemperatur, inden den sprøjtes ind i prøveholderens glascuvette. Resten af opløsningen placeres umiddelbart herefter i dybfryseren, og i de fleste tilfælde vil man kunne tø den op, og tage endnu en prøve fra (dette har jeg dog kun gjort i et enkelt tilfælde).

Hvert lipid undersøges i temperaturområdet fra 6° under til 6° over main faseovergangstemperaturen (enkelte dog i et lidt større temperatur område). Der fokuseres specielt på området lige omkring overgangstemperaturen. I tabel 6.1 er angivet faseovergangstemperaturerne for de tre lipider, jeg undersøger. Den kan dog variere lidt fra prøve til prøve indenfor ca.  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  på grund af små forskelle i præparationen.

For hvert lipid præpareres mindst to prøver, som hver undersøges gennem to

Lipid	$T_p$	$T_m$
DMPC	11°C	23°C
DMPC-d54	?	17°C
DC13PC	1°C	14°C

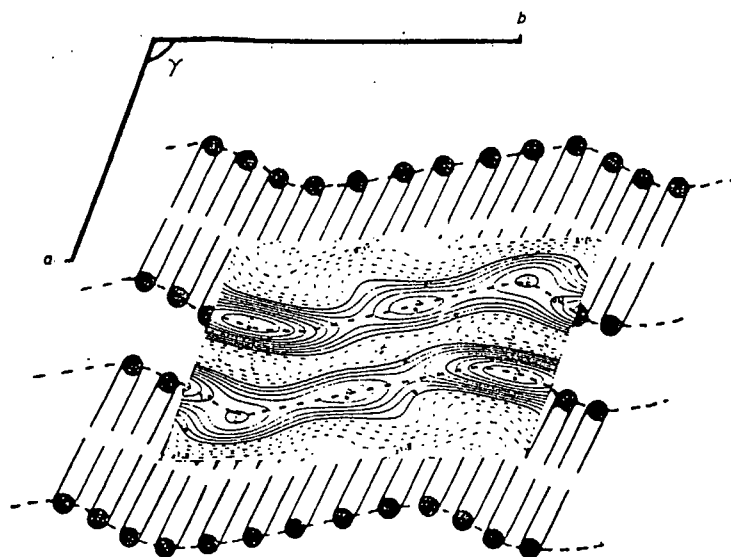
**Tabel 6.1:** Tabel over faseovergangstemperaturerne for pre-transition ( $T_p$ ) og main faseovergangen ( $T_m$ ) for de tre lipider. Oplysningerne er hentet fra [Cevc], [Hønger et al., 1994] og katalog fra Avanti Polar Lipids, Inc. Jeg har ikke kunnet finde oplysninger om  $T_p$  for deutereret DMPC, men man kan gætte på, at den ligger omkring 5°C, hvis der er samme afstand imellem de to faseovergangstemperaturer som for DMPC.

eller tre opvarmninger. Imellem hver opvarmning står prøven i cuvetten ved stuetemperatur i ca. 12 timer (da der kun kan måles om natten af hensyn til temperaturens stabilitet). Der er to grunde til, at jeg gennemgående udfører flere opvarmninger for hver prøve. Først og fremmest ønsker jeg, at få så mange data som muligt ud af hver prøve. Dernæst ønsker jeg at undersøge reproducerbarheden af resultaterne for hver prøve. På et tidligt tidspunkt i forløbet så jeg en gennemgående tendens til, at anomalien var kraftigere for anden opvarmning af prøverne end for første opvarmning. Dette ønskede jeg at undersøge yderligere, og jeg udførte derfor systematisk tre opvarmninger for de efterfølgende prøver. Tendensen viste sig ikke at være holdbar, hvilket også vil fremgå af de følgende afsnit med de eksperimentelle data.

Hver gang røntgenkameraet tages i brug efter at have stået stille et stykke tid, skal alle indstillingerne sættes (se afsnit 4.2.1). For hver måleserie (dvs. hver præpareret prøve) vil jeg i de følgende afsnit angive den konkrete eksperimentelle opsætning (og andre relevante oplysninger) i et skema.

De første eksperimenter er udført med kun en enkelt måling for hver temperatur over temmelig kort tid (500-600 sekunder), men da der er meget statistisk støj på disse spektre, har jeg udført de følgende eksperimenter (fra maj måned og frem) med tre målinger for hver temperatur ialt over ca. 1.5-3 gange så lang tid (900-1200 sekunder), så der blev mindre støj. Derudover har jeg på disse senere eksperimenter ladet prøverne stabilisere et stykke tid (svingende fra 800 til 6000 sekunder) på en temperatur lidt lavere end starttemperaturen for målingerne. Dette gør jeg dels for at sikre mig, at ripple fasen har stabiliseret sig, dels for at gøre alle serier på alle lipider så ens som muligt. For en enkelt serie på deutereret DMPC var denne stabiliseringstemperatur dog muligvis i lipidets gelfase. For hvert temperaturskridt har jeg ladet prøverne stabilisere i 800 sekunder. Dette gælder for alle serier.





**Figur 6.1:** Strukturen af ripple fasen med de to gitterkonstanter er angivet. de viste konturer er for elektron densiteten fundet ved hjælp af krystallografiske data fra røntgenspredning [Tardieu og Luzzati, 1973].

## 6.2 Forventede eksperimentelle kurver

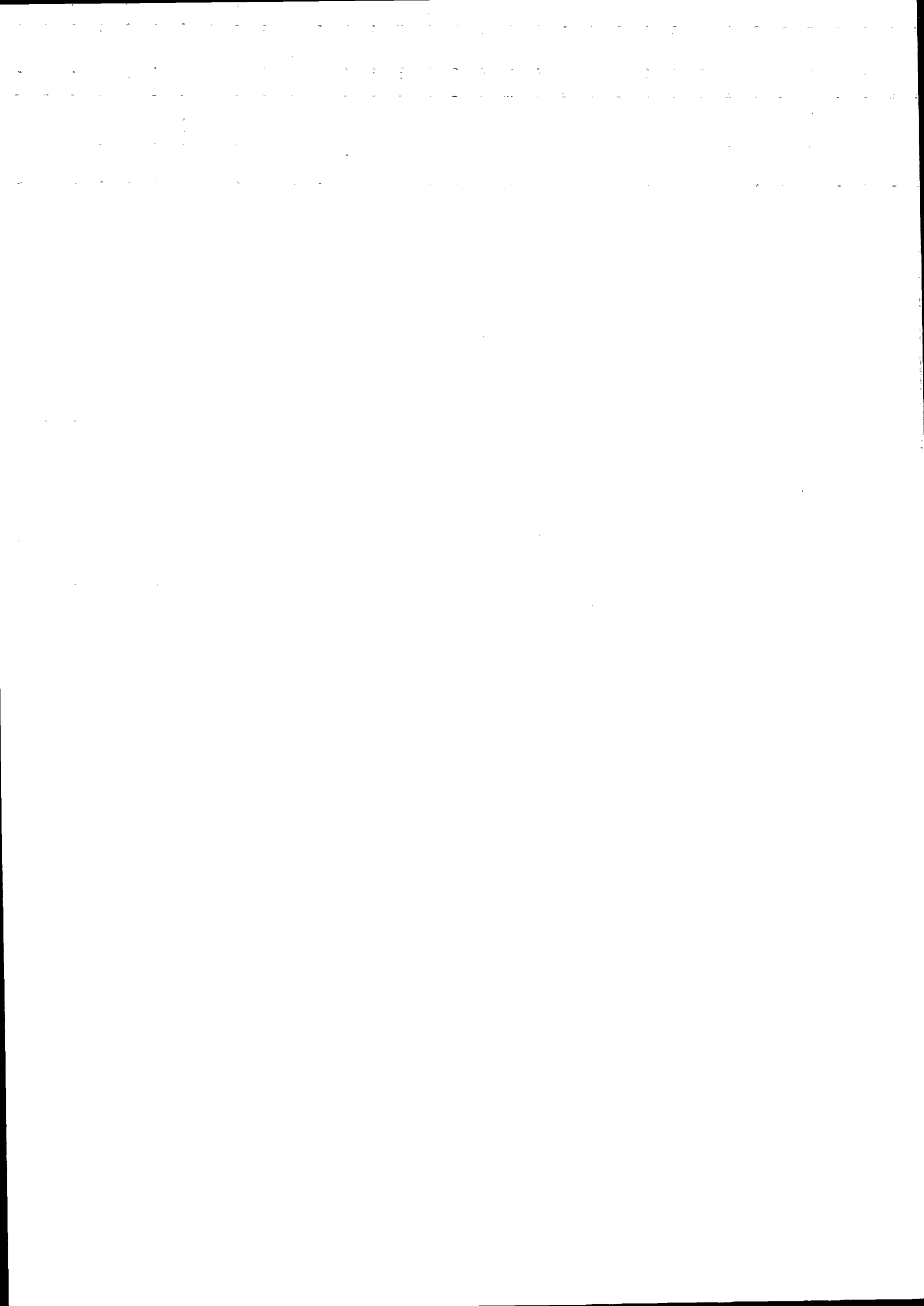
I dette afsnit vil jeg beskrive, hvordan jeg forventer, at mine spredningsdata vil se ud, baseret fortrinsvis på [Wack og Webb, 1989] og [Tardieu og Luzzati, 1973].

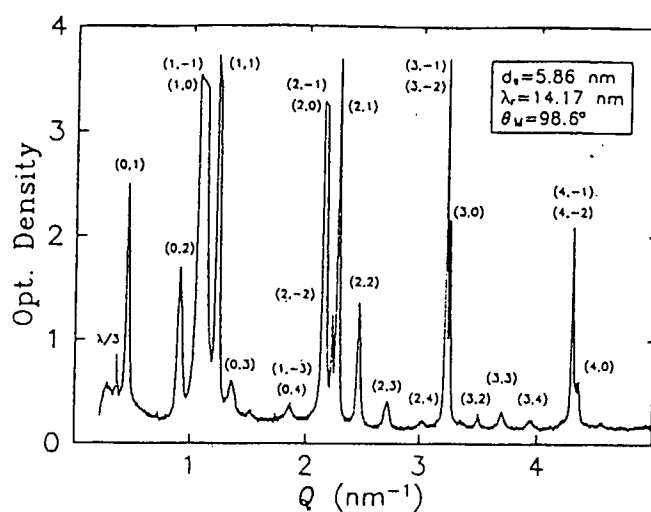
Jeg kommer kun til at se på spektre for de to faser  $P_{\beta'}$  og  $L_{\alpha}$ .

I ripple fasen  $P_{\beta'}$  er strukturen i dobbeltlagene på molekylært plan endnu ikke fastlagt, selvom der er mange forskellige teorier [Wack og Webb, 1989]. Den basale struktur er dog indfanget i [Tardieu og Luzzati, 1973], hvor det vises, at småvinkel spredningen i ripple fasen svarer til spredning fra et to-dimensionalt monoklint gitter, dvs. et gitter med to gitterkonstanter; repeat distance og ripple længden. Vid-vinkel spredningen svarer til, at fedthalerne er udstrakte og hælder i forhold til normalen på membranerne. I figur 6.1 er strukturen for ripple fasen vist med de to gitterkonstanter angivet.

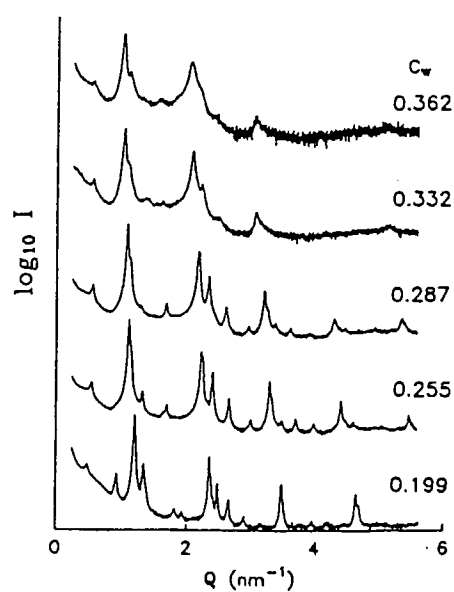
I [Wack og Webb, 1989] præsenteres et detaljeret småvinkel spektrum for ripple fasen optaget med høj-resolution røntgen pulver diffraktion (se figur 6.2). Der ses tydelige toppe for begge gitter konstanter ( $hl$ ), hvor  $h$  er den lamellare konstant og  $l$  er ripple konstanten. Det vises dog også at yderligere hydrering øger gitter uordenen, så toppene bliver mere utydelige (se figur 6.3). Den højeste viste vandkoncentration svarer til fuld hydrering, og det vil være







Figur 6.2: Mikrodensitometer spor af høj-resolution røntgen diffraktion mønster for DMPC (ikke fuldt hydreret) i ripple fasen [Wack og Webb, 1989].



Figur 6.3: Diffraktionsmønstre for DC13PC i ripple fasen ved stigende vandkoncentrationer,  $c_w$  [Wack og Webb, 1989].



spektre som det, jeg kan forvente at se i ripple fasen. Der er to tydelige toppe (10 og 20) svarende til den lamellare gitterkonstant (dvs. repeat distance) og en svag tredie ordens top (30). Desuden er der få (to-tre) toppe svarende til ripple konstanten, hvor den ene er at se som en sidetop til (10)-toppen, og svarer til enten (11)-toppen eller (02)-toppen. På (20)-toppen ses der en asymmetri, som ligeledes må skyldes en ripple-top. Spektrene i figur 6.3 har dog en opløsning mht.  $q$ -værdi, der er ca. 8 gange så stor, som den vi kan opnå med Kratky kameraet.

Ripple fasen kan være meget lang tid om at stabilisere sig, og der kan gå op til flere timer, før den er fuldført [Cevc]. Dette har jeg ikke været opmærksom nok på, så jeg kan forvente at komme til at se en vis stabiliseringstid i nogle serier.

Den flydende krystallinske fase har kun én konstant, repeat distance. I denne fase forventer jeg derfor kun at se toppe svarende til første og anden (og en svag tredie) orden for den lamellare afstand.

Ingen målinger foregår i gelfasen.

Alt efter, hvordan man mener, at de multilamellare vesikler kan beskrives, vil man også have nogle forventninger for bredden af Bragg-toppene. For en parakrystallinsk model (se kapitel 3) vil bredden af en top generelt afhænge af kvadratet på ordenen af toppen [Glatte og Kratky]. For en specifik model [Glatte og Kratky], kan bredden f.eks. vises at være givet ved

$$B_n = D^{-1} \pi^2 n^2 \left( \frac{\Delta}{D} \right) \quad (6.1)$$

hvor  $n$  er ordenen af toppen,  $D$  er repeat distance og  $\Delta$  er fluktuationer i repeat distance. Den specifikke formel for  $B_n$  vil være forskellig fra model til model (parakrystallinske), men det er generelt, at afhængigheden af ordenen skal være  $n^2$ . Anden ordens toppene vil altså være ca. 4 gange så brede som første ordens toppene.

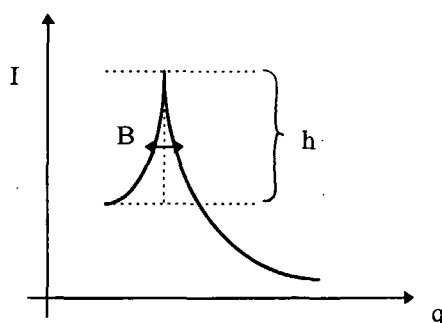
I Caillés teori med  $\eta$ -koefficienter, vil toppenes form være givet som  $|q - q_h|^{-1+\eta}$  (se kapitel 3), hvor  $\eta$  er givet som i afsnit 3.2.  $\eta$  afhænger af kvadratet på ordenen af en top, men da denne indgår som potens i ligningen for toppens form, vil bredderne af toppene ikke afhænge simpelt af kvadratet på ordenen.

På grund af den instrumentelle smearing, vil toppene i mine spektre ikke være så symmetriske som i figur 6.2 og 6.3. Det kan forventes, at hældningen af toppene vil være mindre stejl for siderne med lave  $q$ -værdier end for siderne med høje  $q$ -værdier. Denne asymmetri bliver mere udtalt jo større  $q$  er, så jeg kan forvente, at forholdet imellem bredderne af toppene på grund af smearingen vil være lidt for stort.

Serie	Dato	Vægt % lipid	Opvarmn.	beamlængde	beamhøjde
1	6-7/2 95	21.1%	2	10 mm	0.015 mm
2	25-27/5 95	19.7%	3	10 mm	0.025 mm
Serie	Højde	Hoved	Filter	Position	Kommentarer
1	6.5	2.1	A	13900	-
2	6.0	2.1	B	13800	-

**Tabel 6.2:** Tabel over de eksperimentelle opsætninger for målinger på DMPC. Se afsnit 4.2.1 for betydningen af de specifikke kameraopsætninger.

Når jeg skal vurdere bredden af en sådan asymmetrisk top, må jeg vælge en konvention for måling af breddens størrelse. For en ideel symmetrisk top vil man som regel måle bredden ved halvdelen af toppens højde. Jeg vælger at gøre det ved at måle bredden ved halvdelen af højden taget fra top-punktet ned til niveauet for toppens lave  $q$ -værdi side.



Fra andre eksperimenter ved jeg, at repeat distance er lavere i den flydende krystallinske fase end i ripple fasen, og at den skal begynde at falde lige ved faseovergangstemperaturen (se f.eks. figur 2.11). Da jeg ikke kender prøvens absolutte temperatur efter kalibrering (se kapitel 5), og faseovergangstemperaturen kan variere lidt fra prøve til prøve, vælger jeg at aflæse faseovergangstemperaturen som den kalibrerede temperatur for det spektrum hvorfra repeat distance begynder at falde. Den vil derfor kunne variere med flere grader fra tabelværdien.

## 6.3 DMPC

Med DMPC har jeg lavet to serier med henholdsvis to og tre opvarmninger. De eksperimentelle oplysninger er angivet i tabel 6.2.



### 6.3.1 1. serie

I figur 6.4 er de rå data (dog korrigeret for baggrund og detektorfølsomhed) for første og anden opvarmning vist i et plot med hhv. kanalnummer og intensitet ud af akserne. For hvert temperaturskridt er intensiteten forskudt med 1, og hvert spektrums temperatur er angivet i figurens højre side. De temperaturer, der er angivet er kalibrerede, og faseovergangstemperaturen er angivet som det spektrum, hvorfra  $h$ -værdien begynder at stige. Udelukkende ved at se på de rå data kan man tydeligt se, at toppenes position (og dermed repeat distance) varierer med temperaturen. Især er det tydeligt - specielt hvis man ser på 2. ordens toppene - at lige omkring faseovergangstemperaturen sker der et pludseligt fald i positionen svarende til en stigning i repeat distance på ca. 0.1 nm. Tallet er fundet ved at aflæse  $h$ -værdien for spektret lige før faseovergangstemperaturen og  $h$ -værdien for spektret angivet som faseovergangstemperaturen på figur 6.4, udregne de tilsvarende værdier for repeat distance og subtrahere. Dette er efterfulgt af en stigning i positionen, dvs. fald i repeat distance. Dette er netop, hvad jeg forventer at se.

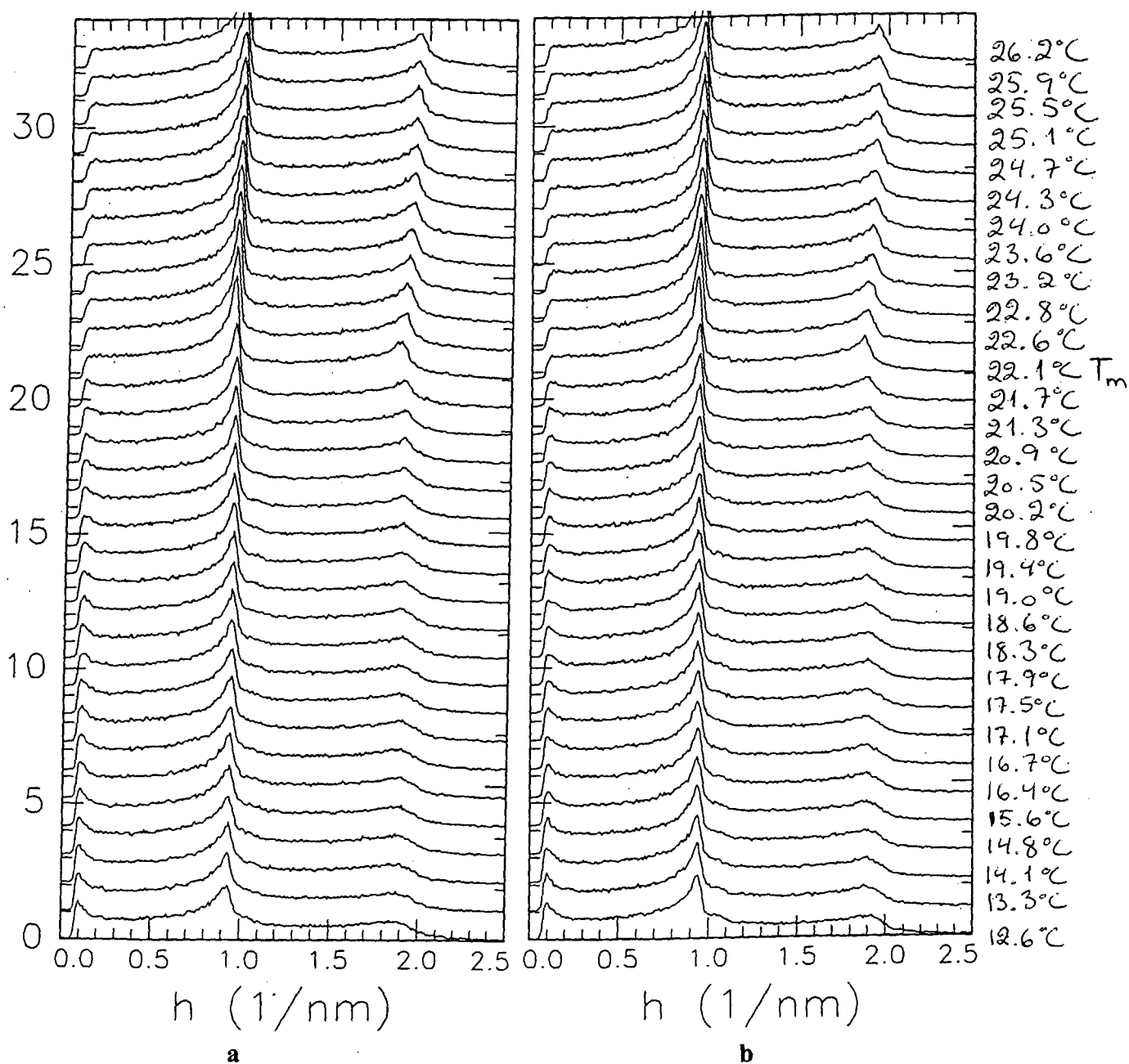
En anden variation, som man umiddelbart kan se ved at kigge på figur 6.4, er i toppenes intensitet. Det er tydeligt, at intensiteten er større i den flydende krystallinske fase end i ripple fasen. Dette ses både for første og anden ordens toppene.

I figur 6.5 er vist to enkelte spektre fra hhv. en temperatur i ripple fasen (17.8°C) og en temperatur i den flydende krystallinske fase (25.5°C). Her ses det tydeligt, at der er en forskel i bredden på første og anden ordens toppene. I ripple fasen er anden ordens toppen ca. 3-4 gange så bred som første ordens toppen. Dette gælder generelt for alle spektrene i ripple fasen. Det ses også her, at første ordens toppen har en lille ekstra struktur på den nedadgående side, som jeg vil kalde en sidetop. Når man kun ser på et enkelt spektrum kunne der godt være tale om statistisk støj, men det er et gennemgående træk for alle spektrene i ripple fasen. Der ses desuden en asymmetri i anden ordens toppen på samme måde som i figur 6.3.

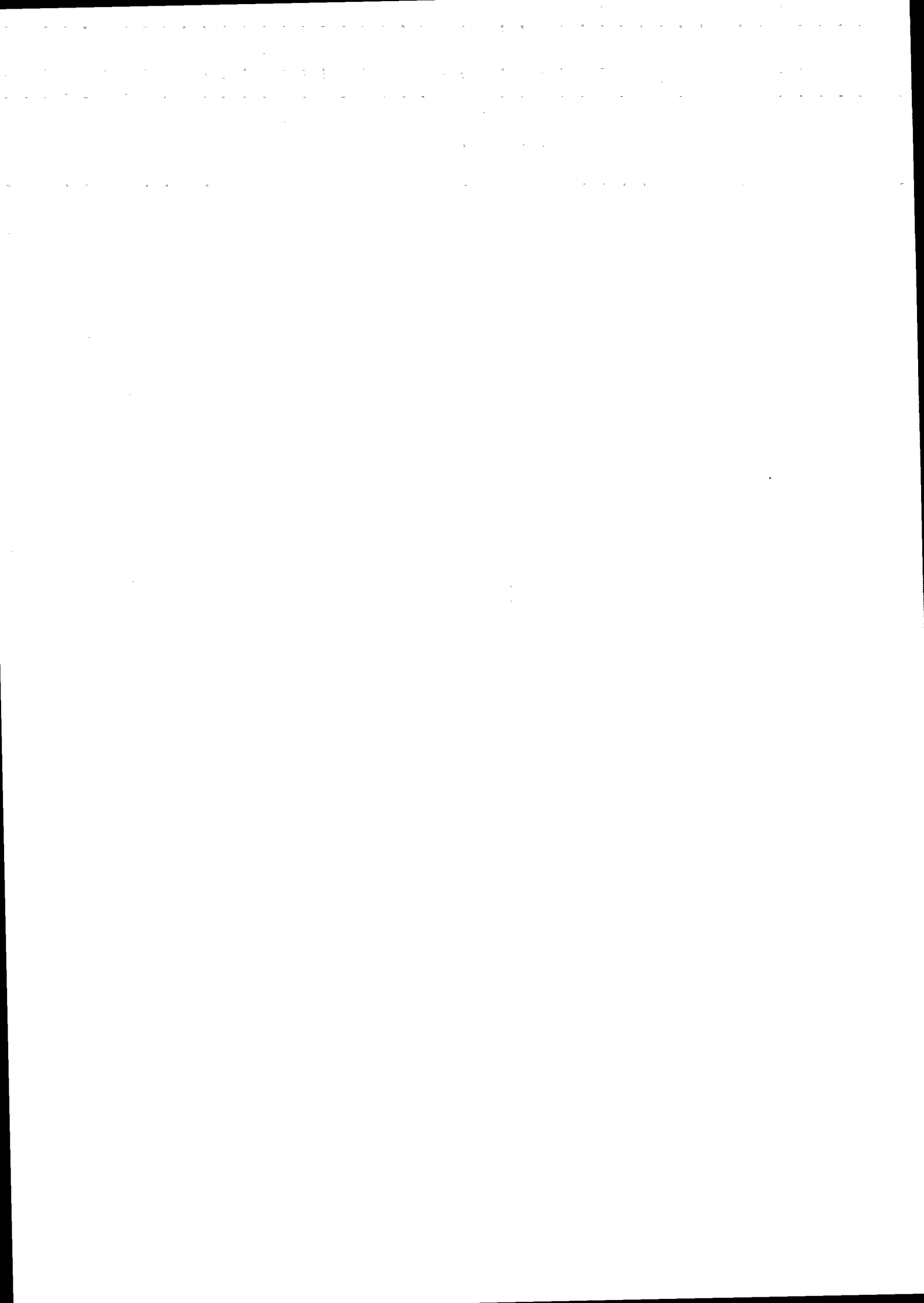
I den flydende krystallinske fase er anden ordens toppen ca. 1.5-2 gange så bred som første ordens toppen, og der er ingen sidetop til første ordens toppen. Desuden er toppene smallere end i ripple fasen. Hvis et enkelt spektrum plottes på samme måde som i figur 6.3, dvs. med logaritmen til intensiteten på y-aksen (figur 6.6) ses det tydeligt, at et spektrum i ripple-fasen er meget lig det, der er vist for en fuldt hydreret prøve i [Wack og Webb, 1989]. Jeg antager altså, at sidetoppen er enten (11)- eller (02)-toppen for ripple-fasen. Den karakteristiske afstand for ripple-fasen er i størrelsesordenen 15-20 nm, og skal derfor give en første ordens top i  $q$ -området  $0.31 - 0.42 \text{ nm}^{-1}$ . Der

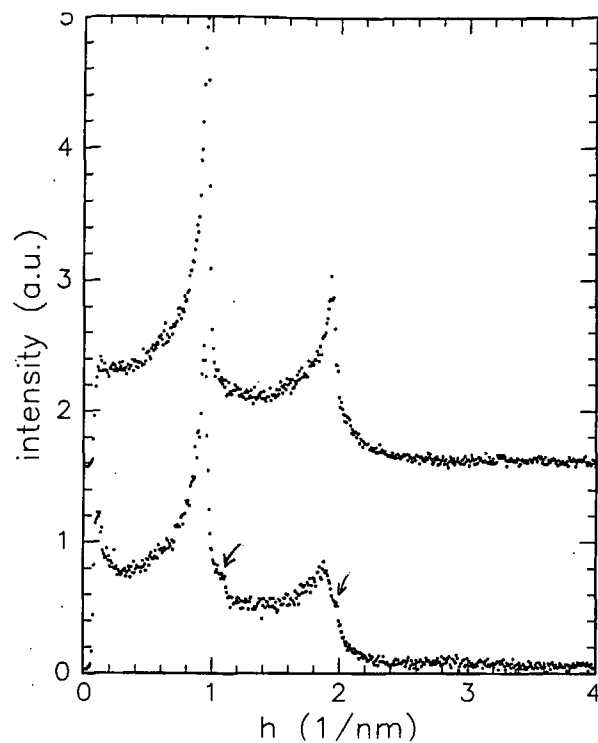




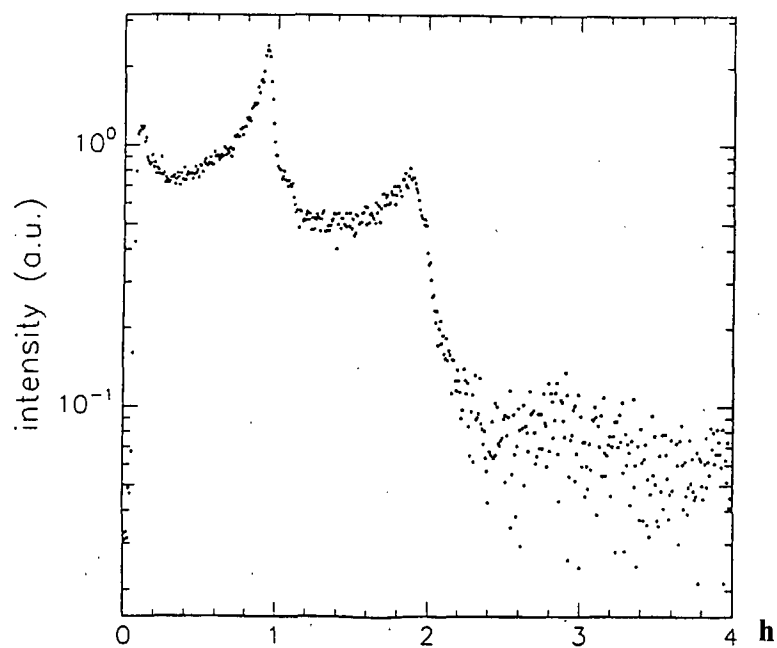


Figur 6.4: De rå data korrigeret for baggrund og detektorfølsomhed vist for (a) første opvarmning og (b) anden opvarmning af DMPC 1. serie. På akserne er hhv.  $q$ -værdi og intensitet. Temperaturen er angivet til højre for hvert spektrum, og det spektrum, hvor faseovergangen sker er angivet med  $T_m$ . Der ses for begge opvarmninger en ændring i både toppenes intensitet og position som funktion af temperaturen.





Figur 6.5: To enkelte spektre ved hhv. 17.8°C og 25.5°C.



Figur 6.6: Spektrum fra ripple fasen (17.8°C) anden serie på DMPC i plot med logaritmen til intensiteten på y-aksen.



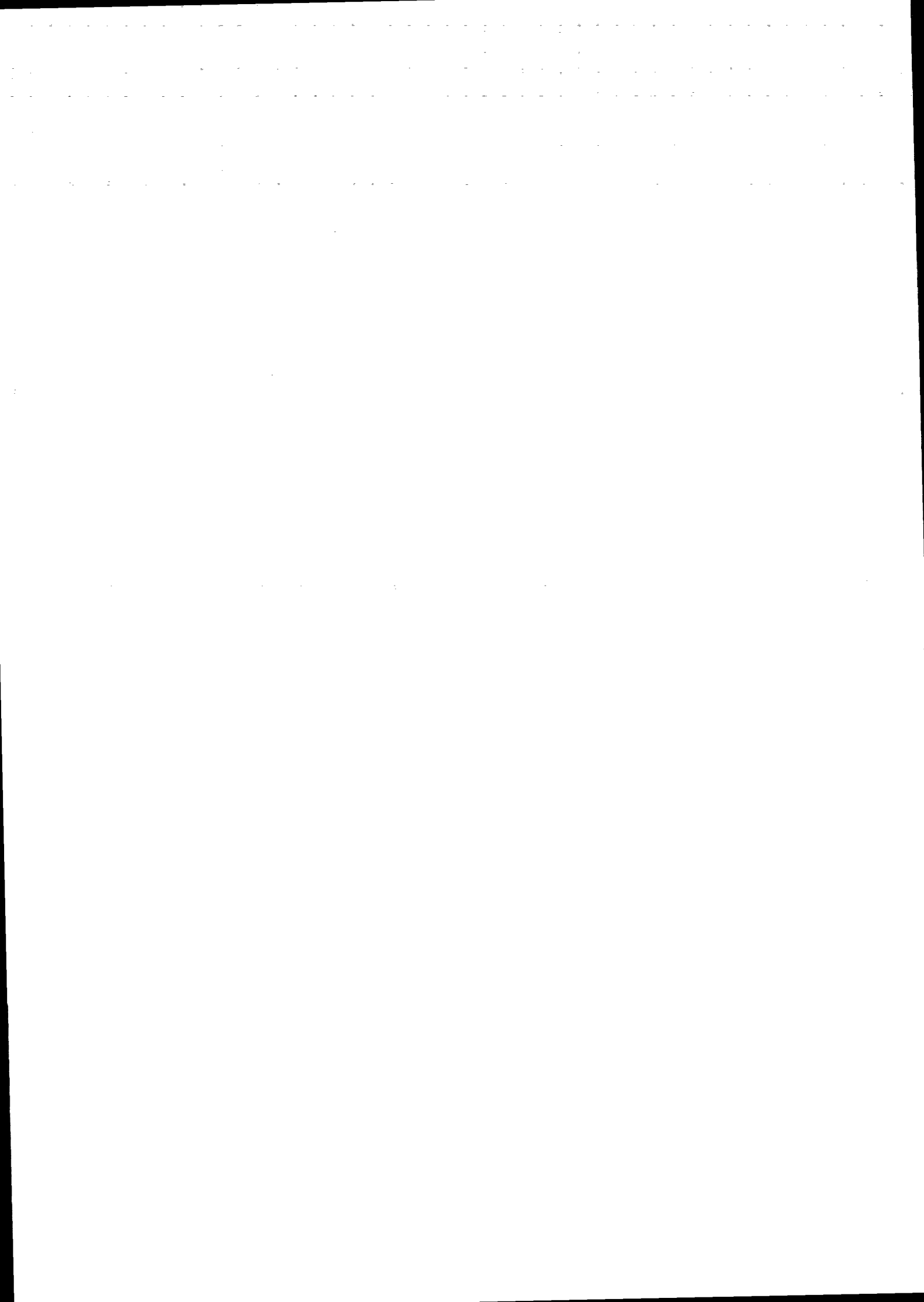
er dog ikke nogen top at se for disse  $q$ -værdier. Det kan skyldes, at toppens intensitet er for lav i forhold til den statistiske støj på spektrene.

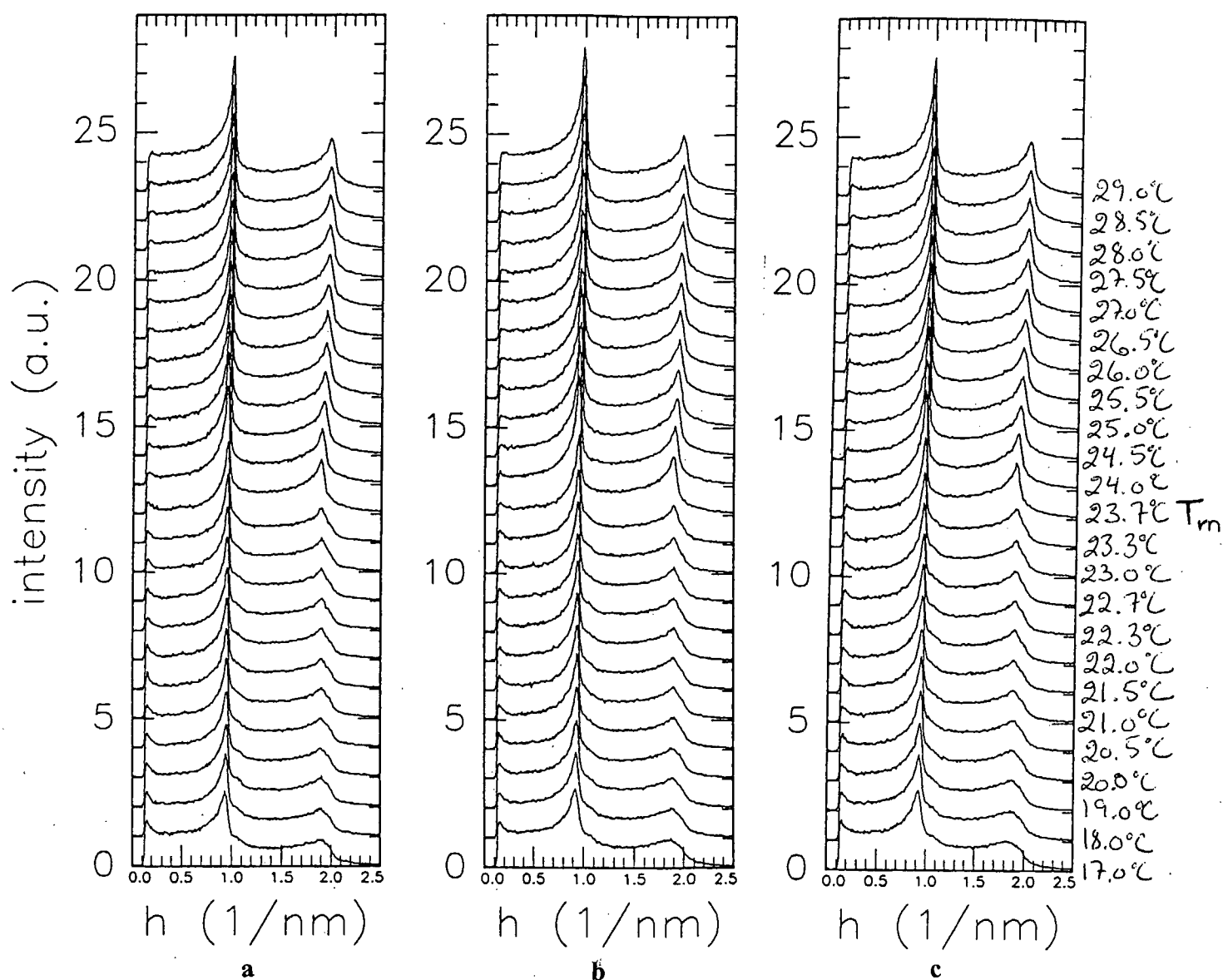
Den fundne sidetop er ikke uden betydning, da den ligger oveni og ændrer (10)-toppens form, og dermed kan få indflydelse på bestemmelsen af (10)-toppens position. Desmearingsproceduren kan ikke genkende den som en top, da den ligger for tæt på den store (10)-top, men vil alligevel blive påvirket af den, når den smearede funktion fittes til de eksperimentelle data. Dette kan naturligvis påvirke aflæsningen af top-positionen, og dermed repeat distance i ripple fasen. Ifølge John F. Nagle kan dette være så stor en fejlaflæsning, at den fuldstændigt forårsager den anomale top i repeat distance som funktion af temperaturen i neutronsprødningseksperimenterne (hvor der kun er lille opløsningsevne i  $q$ -værdi; ca.  $0.033 \text{ nm}^{-1}$  imellem hvert datapunkt), og at den anomale top helt ville forsvinde, hvis man tog højde for sidetoppene [Nagle]. Dette vender jeg tilbage til i næste kapitel.

### 6.3.2 2. serie

I denne serie er der tre opvarmninger. De rå data for alle tre opvarmninger er vist i figur 6.7. Ligesom for første serie ses det tydeligt, at der sker et pludseligt fald i toppenes position ved faseovergangstemperaturen, efterfulgt af en stigning. Dette svarer til en pludselig stigning i repeat distance på ca.  $0.01\text{--}0.03 \text{ nm}$ , efterfulgt af et fald, som jeg også forventer at se det. Ligeledes ses det, at intensiteten af toppene er størst i den flydende krystallinske fase. For denne måleserie er der mindre statistisk støj end for første serie, idet jeg har målt over længere tid opdelt på flere spektre, så jeg har kunnet tage gennemsnit og dermed formindske støjen (se afsnit 4.4). Dette betyder, at jeg nemmere kan skelne detaljer i spektrene. Hvis man ser på et enkelt spektrum fra ripple fasen er det tydeligt at se sidetoppen til (10)-toppen, og der ses også en asymmetri på (20)-toppen (se figur 6.8). Dette er dog mest udtalt for de laveste temperaturer i ripple fasen. Ser man på figur 6.7, kan man også se, at spektrene for de laveste 2-3 temperaturer er anderledes end de efterfølgende; positionen af toppene er lavere og intensiteten er lavere, og der sker en gradvis stigning fra spektrum til spektrum. Dette ses generelt for alle tre opvarmninger i ripple fasen. Jeg tror, at dette må have noget med stabilisering af ripple fasen at gøre. Ifølge John F. Nagle [Nagle] kan ripple fasen være lang tid om at indstille sig, især tæt på  $T_m$ . Da jeg i mine eksperimenter allerede har haft en ripple fase med to gitterkonstanter, inden jeg når temperaturer tæt på  $T_m$ , er jeg dog ikke sikker på, at dette kan være årsagen.

Ligesom for første serie er bredden af anden ordens toppen ca. 3-4 gange så

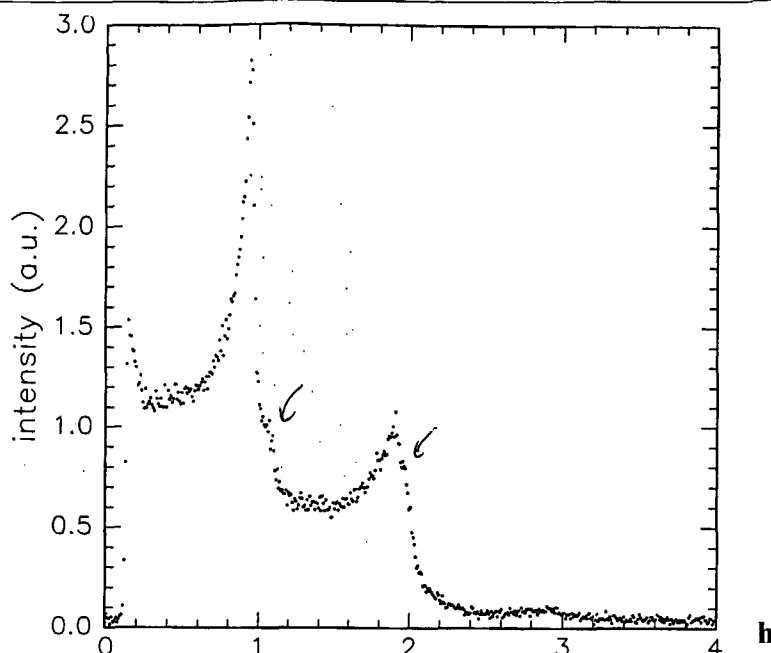




Figur 6.7: De rå data for anden måleserie på DMPC; tre opvarmninger korrigeret for baggrund og detektortrædens følsomhed. På akserne er hhv.  $q$ -værdi og intensitet. Temperaturen for hvert spektrum og faseovergangstemperaturen er angivet i højre side.







**Figur 6.8:** Et enkelt spektrum fra ripple fasen (første opvarmning, anden serie på DMPC). Der ses tydeligt sidetoppe til både (10)- og (20)-toppene.

stor som bredden af første ordens toppen i ripple fasen, mens den kun er ca. 1.5-2 gange så stor i den flydende krystallinske fase. Toppene er smallest i den flydende krystallinske fase.

### 6.3.3 Opsamling

For eksperimenterne med DMPC observerer jeg, ved at se på de rå data alene, en tydelig tendens til en anomal top på hhv. ca. 0.1 og 0.01-0.03 nm i repeat distance omkring faseovergangstemperaturen. Der er altså en stor forskel på de to serier.

Jeg ser ligeledes, at intensiteten i toppene er større i den flydende krystallinske fase end i ripple fasen for begge serier. Bredden af anden ordenstoppen er ca. 3-4 gange så stor som bredden af første ordenstoppen i ripple fasen, mens den er kun ca. 1.5-2 gange så stor i den flydende krystallinske fase.

Jeg observerer sidetoppe til første ordens Bragg-toppene og asymmetrier på anden ordens toppene i ripple fasen; i anden serie dog fortrinsvis for de laveste temperaturer. Dette kan muligvis forårsage en fejlaflæsning af repeat distance i denne fase. På de rå data ser det dog ikke umiddelbart ud som om den anomale top i repeat distance vil forsvinde, hvis man tog højde for sidetoppenes ændring af (10)-toppenes form.



Serie	Dato	Vægt % lipid	opvarmn.	beamlængde	beamhøjde
1	17-20/3 95	19.9%	2	10 mm	0.015 mm
2	21-22/3 95	19.9%	2	10 mm	0.015 mm
3	15-16/5 95	16.8%	2	10 mm	0.025 mm

Serie	Højde	Hoved	Filter	Position	Kommentarer
1	6.5	2.1	A	13900	-
2	6.5	2.1	A	13900	Samme præparering som 1.serie, taget fra fryseren
3	6.0	2.1	B	13800	Problem med filtergrænsen

**Tabel 6.3:** Tabel over den eksperimentelle opsætning for målinger på DMPC-d54.

## 6.4 DMPC-d54

På deutereret DMPC har jeg udført tre måleserier alle med to opvarmninger. De eksperimentelle opsætninger er angivet i tabel 6.3.

### 6.4.1 1. serie

De rå data korrigeret for baggrund og detektorfølsomhed er vist i figur 6.9. Jeg observerer, at toppenes positioner varierer med temperaturen, svarende til at repeat distance stiger lige omkring faseovergangstemperaturen med ca. 0.05 nm i første opvarmning og ca. 0.15 nm i anden opvarmning for derefter at falde igen. Jeg observerer desuden samme variation i toppenes intensitet som for DMPC, dvs. størst intensitet i den flydende krystallinske fase. Bredden af anden ordenstoppene er generelt ca. 3 gange så stor som bredden af første ordens toppene i ripple fasen, og ca. 1.5-2 gange så stor i den flydende krystallinske fase. Toppene er smallest i den flydende krystallinske fase.

Også her observerer jeg sidetoppe til første ordens toppene i ripple fasen (se figur 6.10). De adskiller sig ikke væsentligt fra sidetoppene beskrevet for ikke-deutereret DMPC udover at være lidt tydeligere. Dette er svært at se på figur 6.10 i forhold til figur 6.5 og 6.8, men kan ses som en generel tendens, når man ser på flere spektre. Da intensiteten af sidetoppene i forhold til den statistiske støj er lav, er der for stor usikkerhed på en aflæsning af sidetoppenes position, til at jeg kan sammenligne dette for DMPC og DMPC-d54.

Ligesom for anden serie på ikke-deutereret DMPC er sidetoppene tydeligst

11-11-11

11-11-11

11-11-11

11-11-11

11-11-11

11-11-11

11-11-11

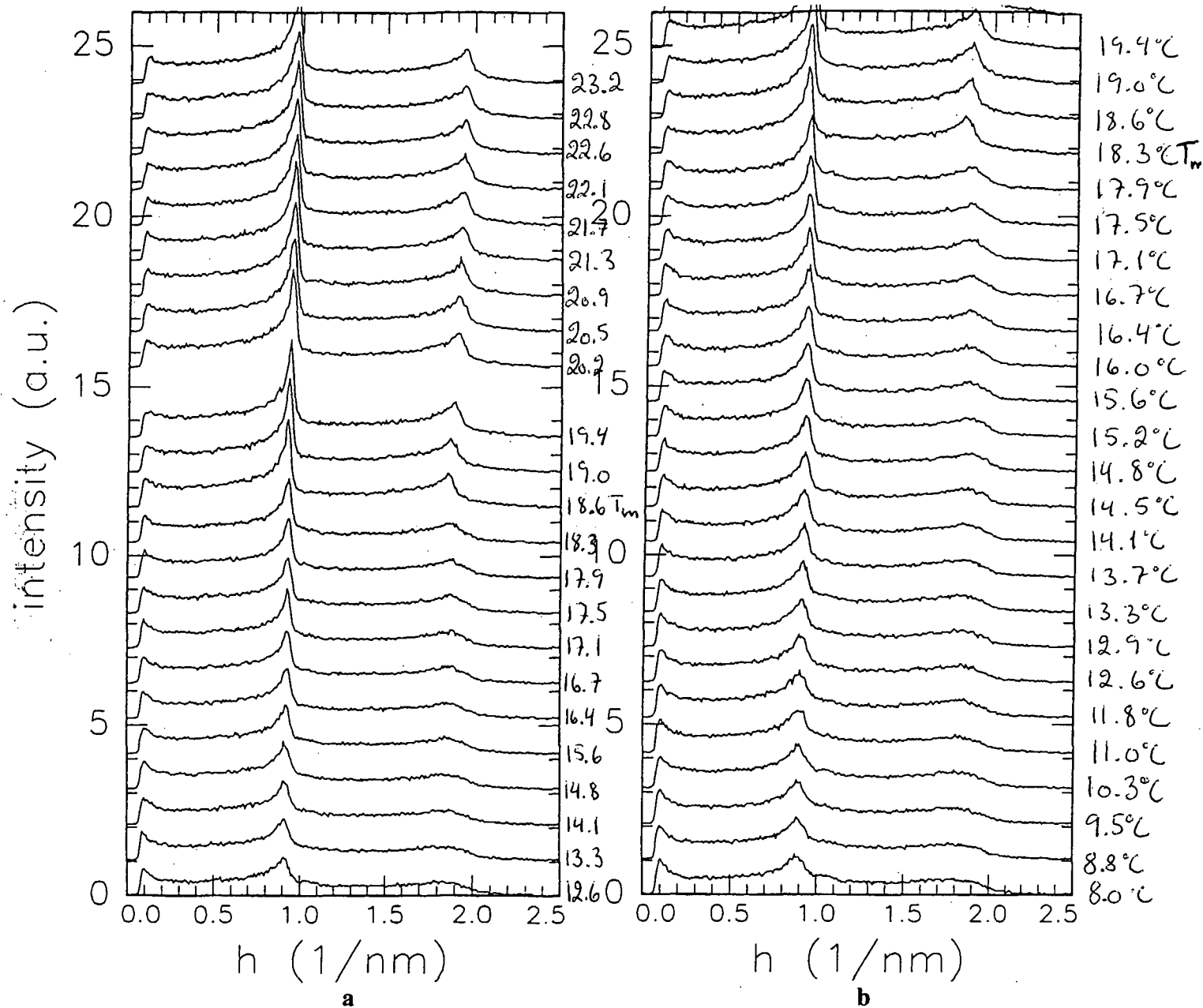
11-11-11

11-11-11

11-11-11

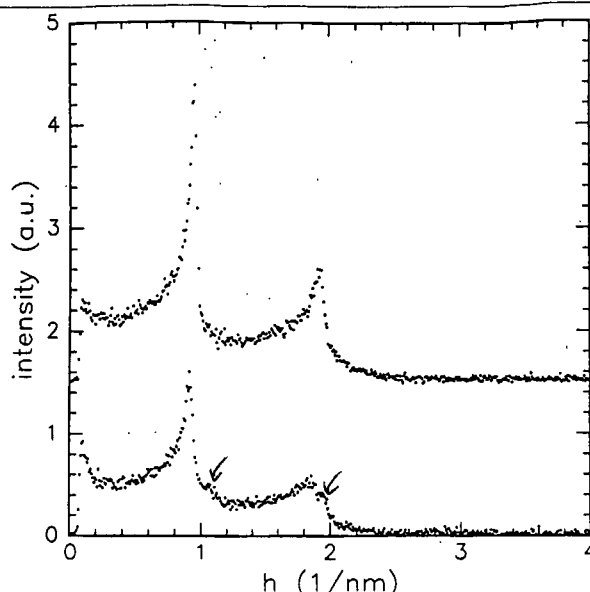
11-11-11

11-11-11



Figur 6.9: De rå data for (a) første og (b) anden opvarmning på DMPC-d54 første serie er vist. For første serie mangler der et spektrum, da der var fejl i datafilen.





**Figur 6.10:** To spektre fra DMPC-d54 første serie hhv. (a) ripple fasen og (b) den flydende krystallinske fase.

ved de laveste 4-5 temperaturer. Der ses også her, at de rå spektre ved de laveste temperaturer er anderledes end de efterfølgende, idet de har en lavere position og en lavere intensitet.

#### 6.4.2 2. serie

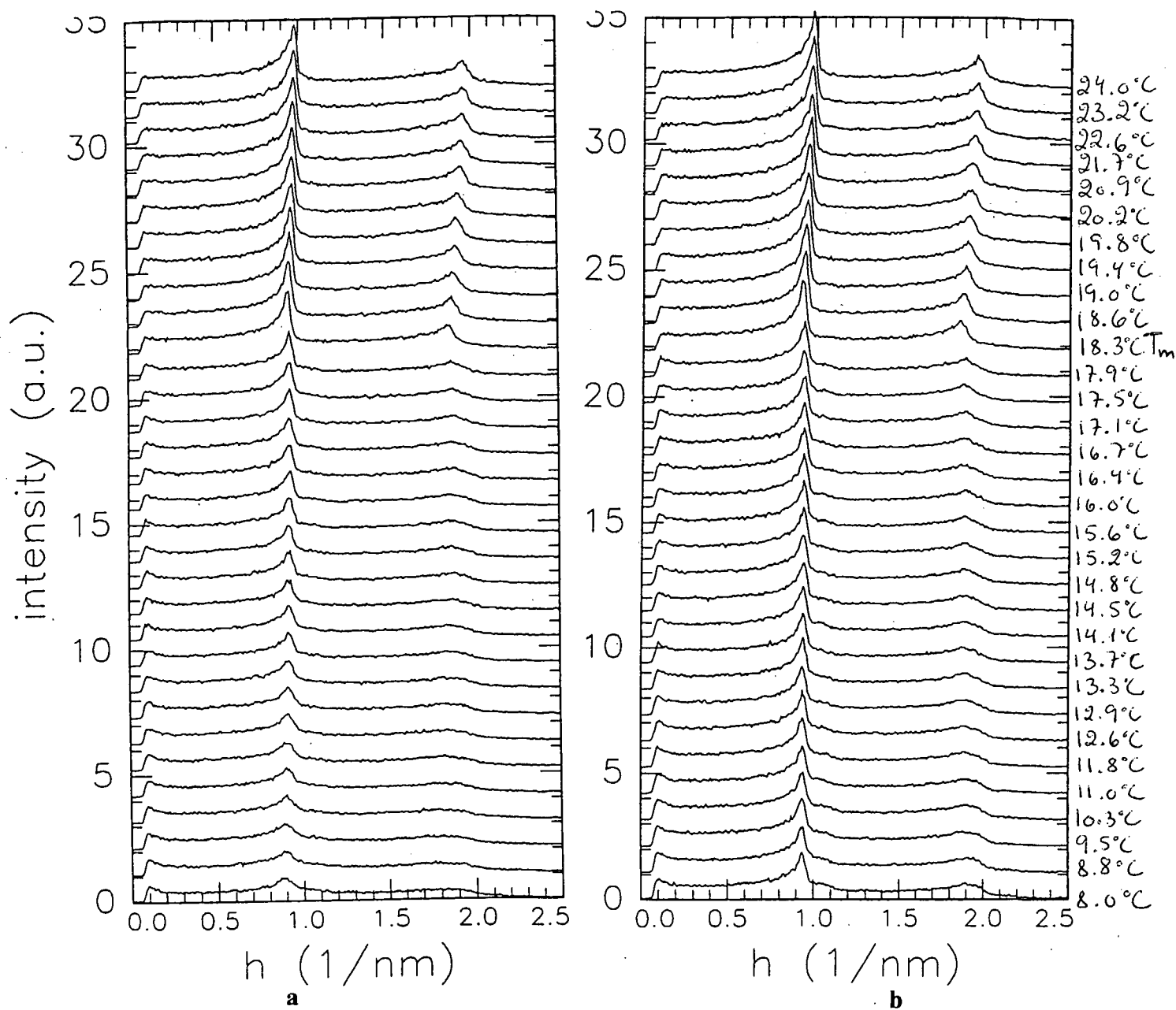
I denne serie er der ligeledes to opvarmninger, og de rå data korrigeret for baggrund og detektorfølsomhed er vist i figur 6.11. Jeg vil ikke kommentere yderligere eller vise flere figurer, men blot konstatere, at man især for første opvarmning kan gøre de samme observationer som for første serie (anden opvarmning adskiller sig dog, idet spektrene for de laveste temperaturer fuldstændig ligner de følgende spektre, og det er svært at se sidetoppe på nogen spektre overhovedet). Stigningen i repeat distance er hhv. ca. 0.02 og ca. 0.04 nm.

#### 6.4.3 3. serie

I denne serie er der mindre statistisk støj end i de to foregående. Det skulle derfor være lettere at se detaljer i spektrene. Desværre var der for første opvarmning et problem med filteret, så der er uforholdsmæssig stor intensitet på filtergrænsen. Det forvansker spektret, som det ses i figur 6.12, hvor de rå







**Figur 6.11:** Rå data for hhv. (a) første og (b) anden opvarmning af DMPC-d54 anden serie.



data for begge opvarmninger er vist, og gør det vanskeligt at uddrage informationer fra det. Denne serie blev fra starten stabiliseret på en temperatur, der er lav nok til måske at være i gelfasen, men der måles ikke ved denne temperatur. Der blev heller ikke stabiliseret i så lang tid (800 sekunder), at det er sandsynligt, at gelfasen nåede at stabilisere sig. Alle temperaturer, hvor der måles, ligger indenfor et område, så kun ripple fasen og den flydende krystallinske forekommer. Det er dog lidt forskudt, så der kun er få målinger i den flydende krystallinske fase, mens der er mange i ripple fasen.

I ripple fasen ses sidetoppe til både første og anden ordens toppene for begge opvarmninger meget tydeligt i hele ripple fasen, og spektrene for de laveste temperaturer er ikke meget anderledes end de følgende.

Det adskiller sig iøvrigt ikke meget fra første serie. For første opvarmning er stigningen i repeat distance ca. 0.1 nm, for anden opvarmning ca. 0.12 nm.

#### 6.4.4 Opsamling

Jeg observerer for DMPC-d54 egenskaber svarende til DMPC mht. positionen af toppene, intensiteten, bredden af toppene samt toppenes form (stigningen i repeat distance ved faseovergangen er lidt større end for DMPC og sidetoppe er generelt lidt tydeligere end for DMPC).

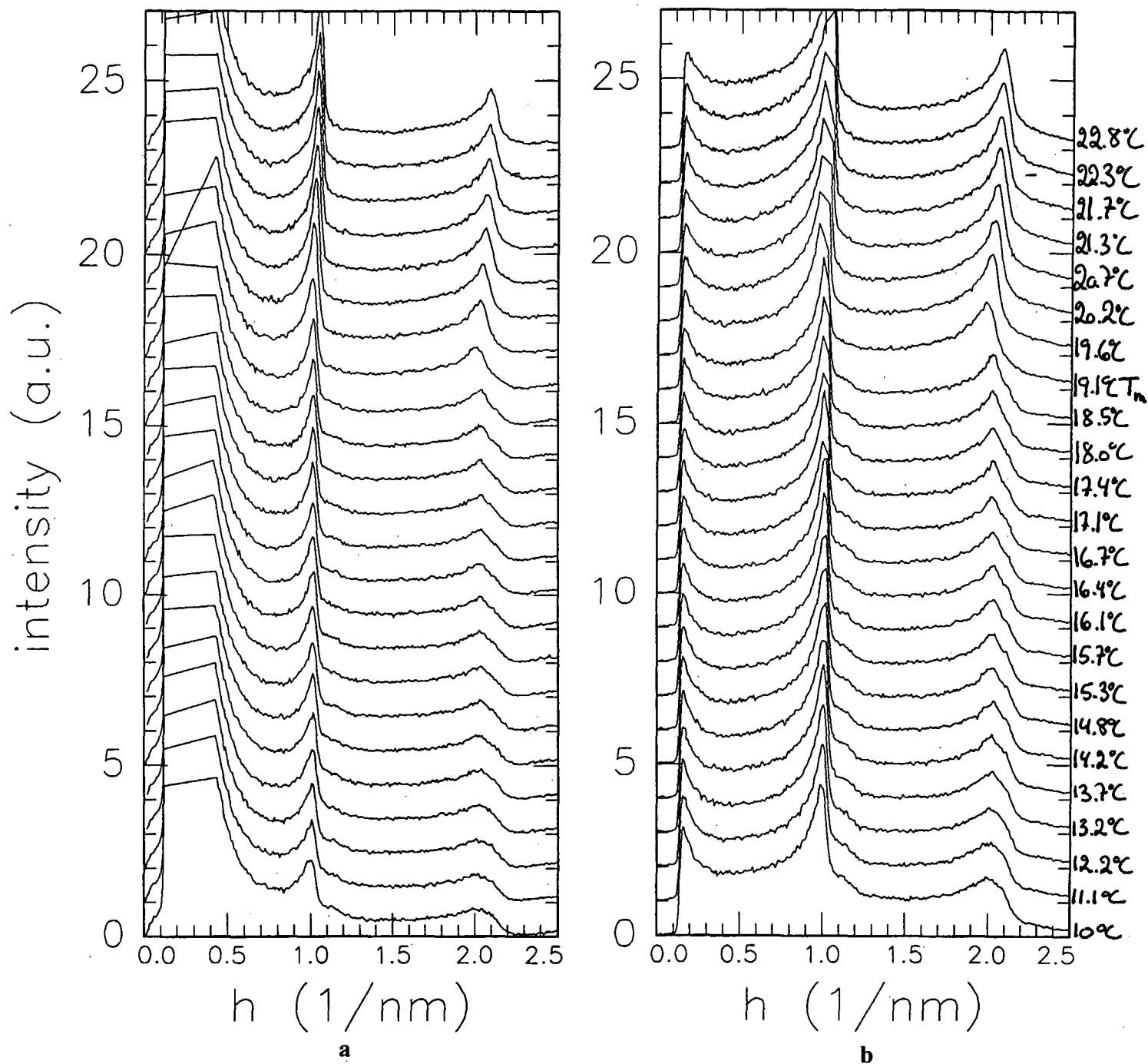
### 6.5 DC13PC

Med DC13PC har jeg udført tre måleserier hver med tre opvarmninger. Desværre er data fra første series anden opvarmning gået tabt, inden jeg overhovedet nåede at se på dem. De eksperimentelle oplysninger for serierne kan ses i tabel 6.4. For alle tre serier har jeg målt i lang tid, fordelt på flere spektre for hver temperatur, så der er kun lidt statistisk støj på de viste gennemsnitlige spektre.

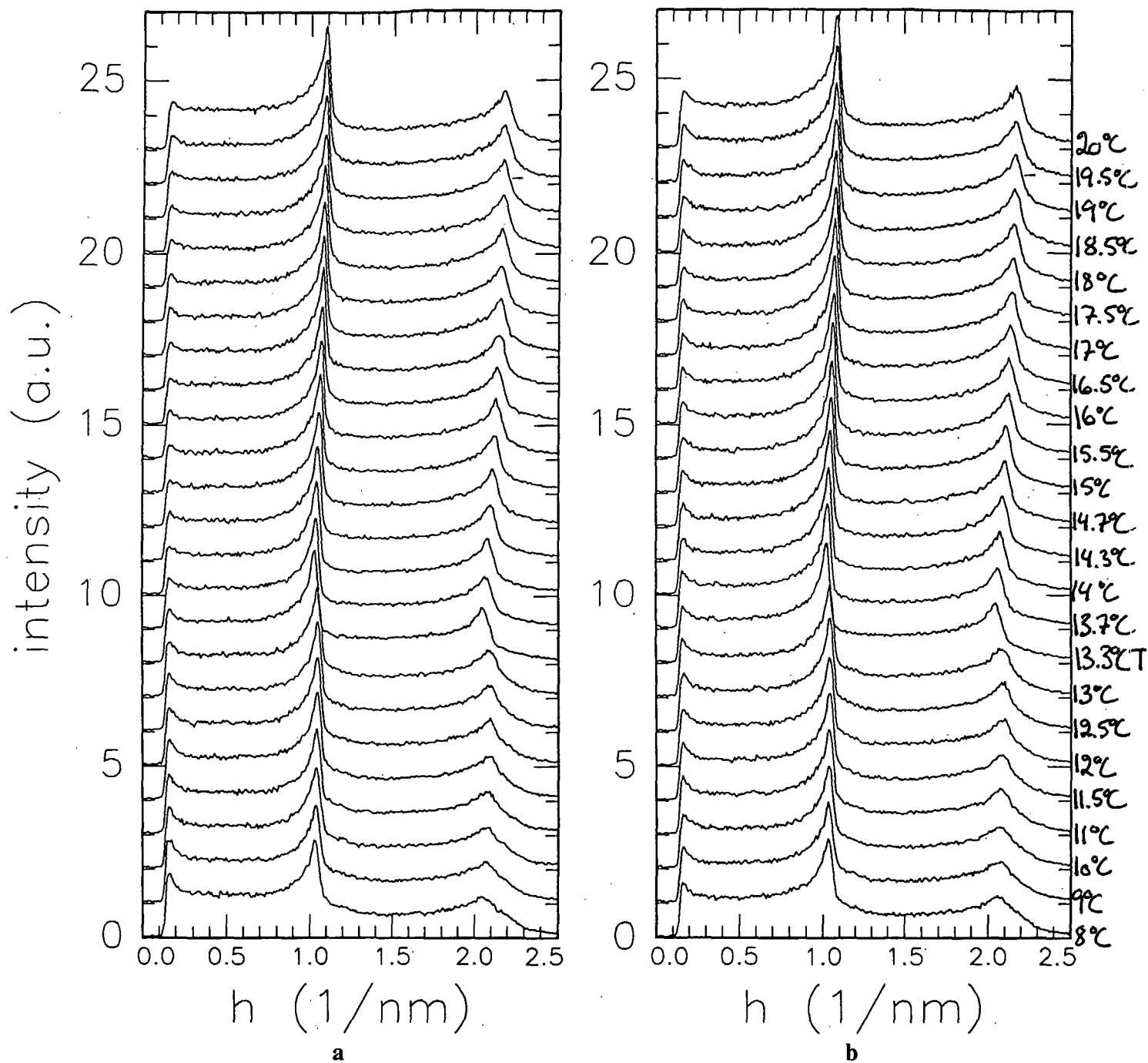
#### 6.5.1 1. serie

I figur 6.13 er vist de rå data korrigeret for baggrund og detektorens følsomhed.

Både for første og tredje opvarmning ses det meget tydeligt, at toppenes position falder lige på faseovergangstemperaturen og derefter stiger igen. Det svarer til en stigning i repeat distance på hhv. ca. 0.18 og 0.16 nm. Det er



Figur 6.12: De rå data for begge opvarmninger på DMPC-d54 tredje serie. I første serie ses der en stor intensitet ved filtergrænsen. For at man overhovedet skal kunne skelne de interessante toppe, har jeg skåret intensiteten af ved en passende lav værdi.



Figur 6.13: De rå data for første serie på DC13PC korregeret for baggrund og detektorens følsomhed vist i plot med hhv.  $q$ -værdi og intensitet på akserne; Temperaturen er angivet i højre side. (a) første opvarmning og (b) tredje opvarmning.

Serie	Dato	Opløsning	Opvarmn.	beamlængde	beamhøjde
1	22-23/5 95	19.8%	3	10 mm	0.025 mm
2	5-7/7 95	20.8%	3	10 mm	0.025 mm
3	12-14/7 95	19.0%	3	10 mm	0.025 mm

Serie	Højde	Hoved	Filter	Position	Kommentarer
1	6.0	2.1	B	13800	Data fra anden opvarmning gået tabt.
2	4.5	2.4	B	3500	Nyt filter
3	6.0	2.4	B	3600	-

**Tabel 6.4:** Tabel over den eksperimentelle opsætning for målinger på DC13PC.

tydeligt både for første og anden ordens toppene, og lidt tydeligere, end det var for DMPC og DMPC-d54.

Til gengæld er tendensen til større intensitet i toppene i den flydende krystallinske fase ikke så tydelig her. Det ses mest for anden ordens toppene.

Bredden af toppene er ca. 2-3 gange større for anden ordens toppene end for første ordens toppene i ripple fasen, mens den i den flydende krystallinske fase kun er ca. 1-2 gange så stor. Toppene er smallest i den flydende krystallinske fase.

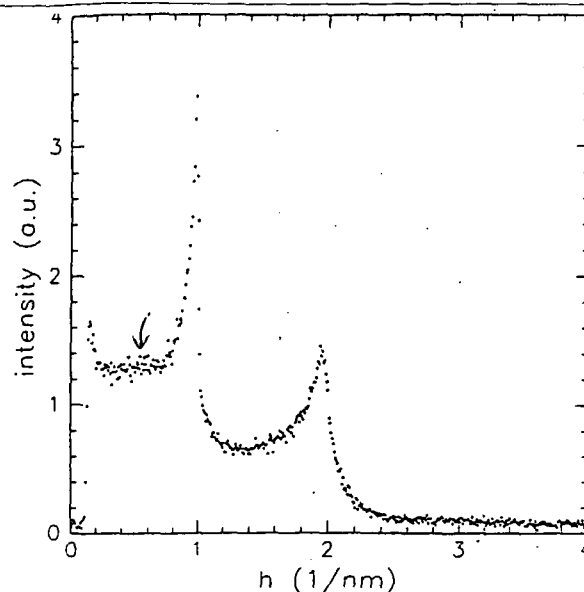
I figur 6.14 ses et enkelt spektrum fra en temperatur i ripple fasen. Der ses kun svag eller slet ikke nogen sidetop til første ordens toppen, selv om spektret er fra en temperatur i ripple fasen. Dette gælder både for første og tredje opvarmning. Der ses en svag top omkring  $0.6 \text{ nm}^{-1}$ , som evt. kan være en (01) ripple top. Når sidetoppene er så svage, kan det enten skyldes, at ripple fasen ikke har stabiliseret sig eller at sidetoppene ikke skal være nær så tydelige som for de to andre lipider (f.eks. på grund af deres position eller deres intensitet).

## 6.5.2 2. serie

I figur 6.15 er vist de rå data for alle tre opvarmninger.

Det ligner meget første serie, både med hensyn til variationen i toppenes position, deres intensitet og deres bredde. Stigningen i repeat distance er for de tre opvarmninger ca. 0.13, 0.12 og 0.19 nm. I disse spektre ses der en svag tendens til en sidetop til første ordens toppen og en svag asymmetri i anden ordens toppen (se figur 6.16), men ikke nogen top, der kunne være (01)-toppen. Sidetoppene er dog ikke nær så udtalte som for DMPC og DMPC-d54. Det er tydeligst ved de laveste par temperaturer. Også her kan man se





**Figur 6.14:** Et enkelt spektrum ved fra DC13PC første serie ripple fasen 13°C. Der ses ikke nogen sidetop.

på de rå data, at ved de laveste temperaturer er positionen af toppene lavere, og intensiteten er lavere.

### 6.5.3 3. serie

De rå data er vist i figur 6.17.

Heller ikke denne serie adskiller sig væsentligt fra første serie, bortset fra at der her ligesom i anden serie er en svag tendens til sidetoppe i ripple fasen. Det er dog endnu svagere end for anden serie, så det er svært at afgøre, hvorvidt de virkelig er der, eller om der er tale om et synsbedrag (se figur 6.18). Der er ingen (01)-top. Stigningen i repeat distance er for de tre opvarmninger hhv. ca. 0.11, 0.15 og 0.14 nm.

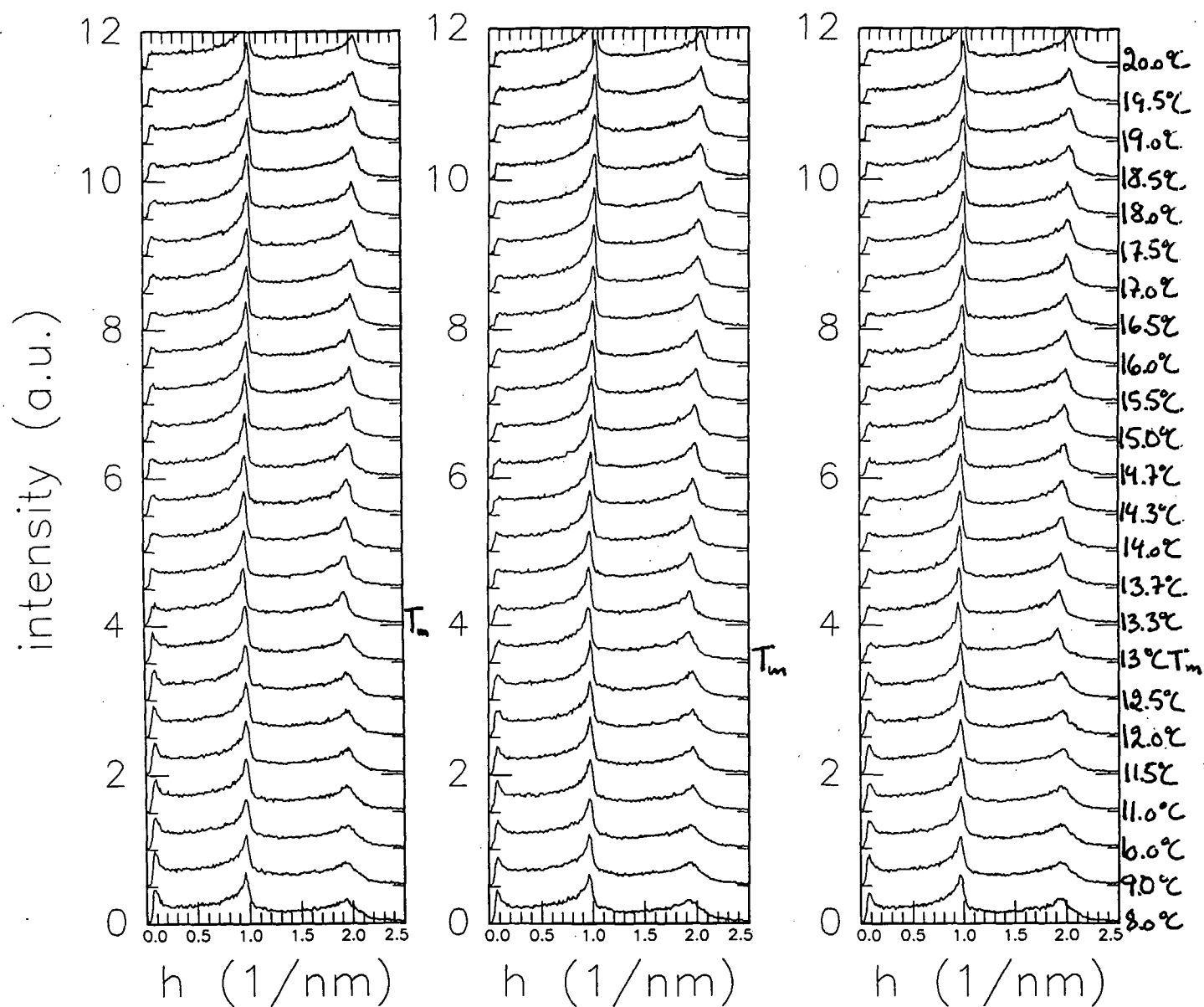
### 6.5.4 Opsamling

For DC13PC ses der en tydelig variation i toppenes position med temperaturen, svarende til en pludselig stigning i repeat distance ved faseovergangstemperaturen på ca. 0.11-0.19 nm efterfulgt af et fald.

Intensiteten er større i den flydende krystallinske fase end i ripple fasen, men ikke så udtalt som for DMPC og DMPC-d54. Bredden af anden ordens toppene i ripple fasen er ca. 2-3 gange så store som første ordens toppene, mens

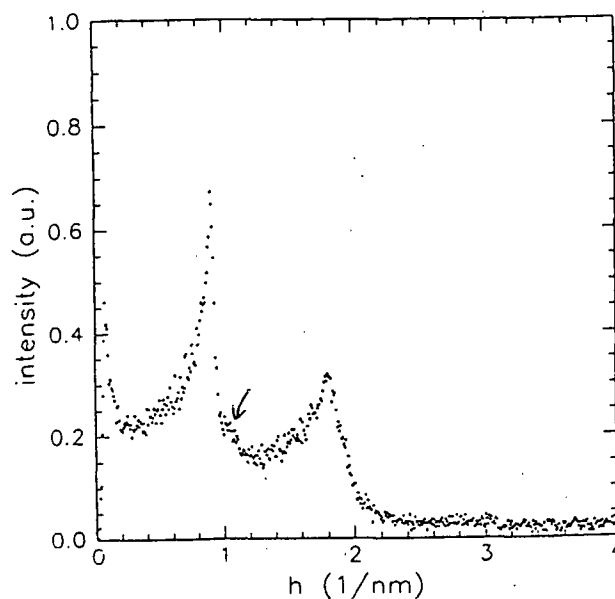






Figur 6.15: De rå data for DC13PC anden serie, tre opvarmninger.





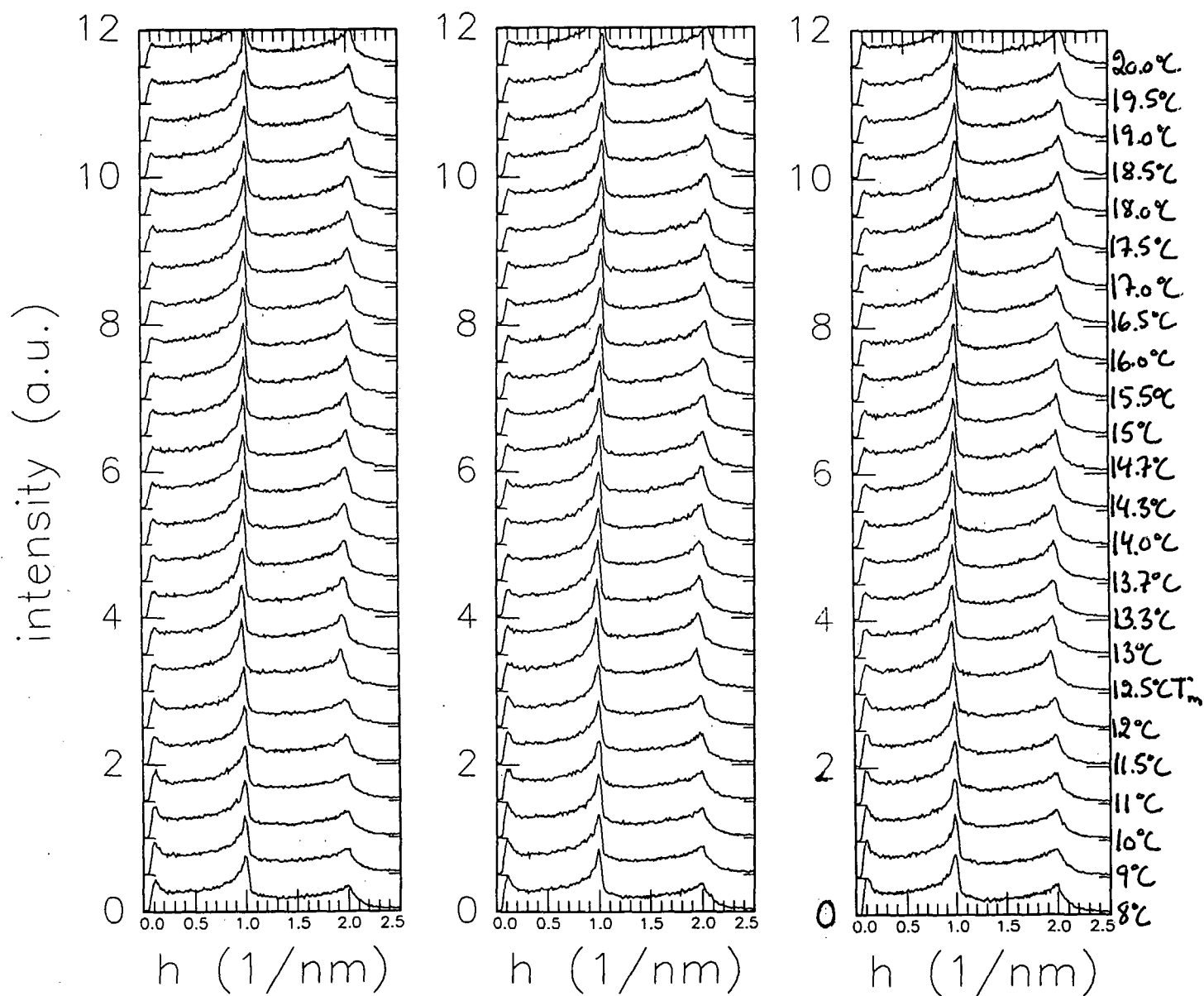
**Figur 6.16:** Et spektrum fra ripple fasen i DC13PC, anden serie, anden opvarmning. Der ses en svag tendens til sidetoppe.

i den flydende krystallinske fase er de kun ca. 1-2 gange så store.

Der ses kun en svag tendens til sidetoppe, og kun for de to sidste serier. Dette kan være en indikator for, at ripple fasen ikke har haft tid til at stabilisere sig. For at afgøre hvorvidt dette er tilfældet har jeg udført en ekstra måleserie på DC13PC, hvor jeg giver prøven flere timer til at stabilisere sig, hver gang jeg skifter temperatur. Jeg har præpareret en ny prøve, og lavet en serie med kun en enkelt opvarmning. Spektrene er ikke meget anderledes end de tidligere spektre. Ved faseovergangstemperaturen sker der et fald i toppenes position, svarende til en stigning i repeat distance på ca. 0.19 nm. Det adskiller sig ikke fra de tidligere serier.

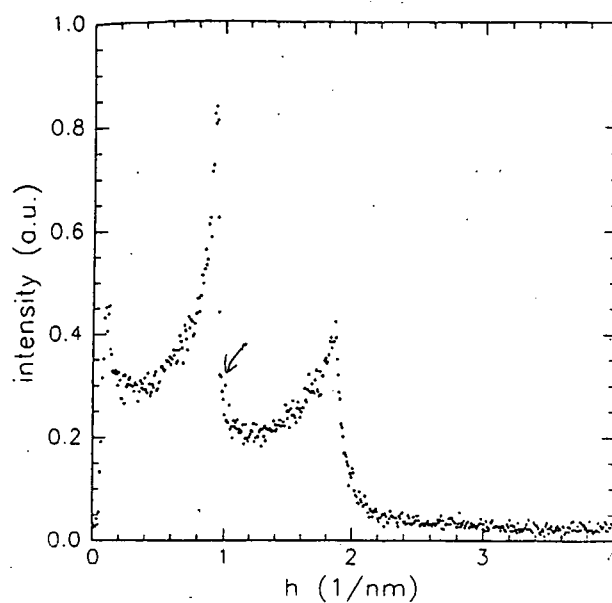
Sidetoppene er lidt tydeligere end de har været for de tre første serier, men stadig ikke lige så tydelige som for DMPC og DMPC-d54 (se figur 6.19). Der er en svag top omkring  $0.6 \text{ nm}^{-1}$ . Det er dog heller ikke givet, at sidetoppene skal være lige så tydelige som for DMPC og DMPC-d54. Det ser ud til at ripple fasen når at stabilisere sig lidt bedre, når der gives længere tid. Det giver dog ikke nogen signifikant ændring i repeat distance variation ved faseovergangstemperaturen.



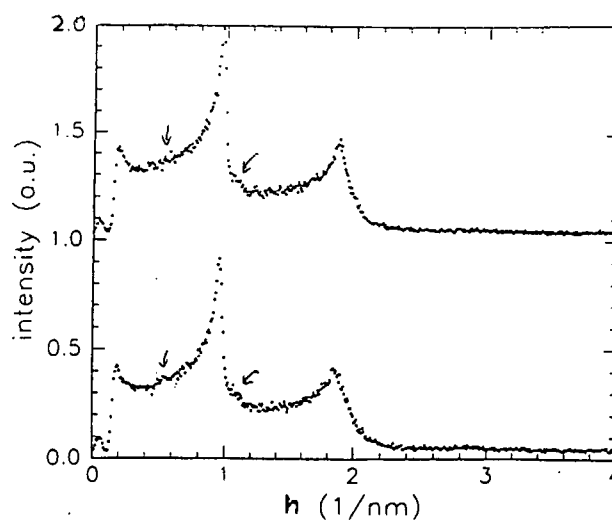


Figur 6.17: De rå data for DC13PC tredje serie, tre opvarmninger.





**Figur 6.18:** Et spektrum fra ripple fasen DC13PC tredje serie, anden opvarmning.



**Figur 6.19:** To spektre fra ripple fasen, DC13PC 4. serie. Der ses tydeligere sidetoppe end for de tre tidligere serier og en lille tendens til en top omkring  $0.6 \text{ nm}^{-1}$ .





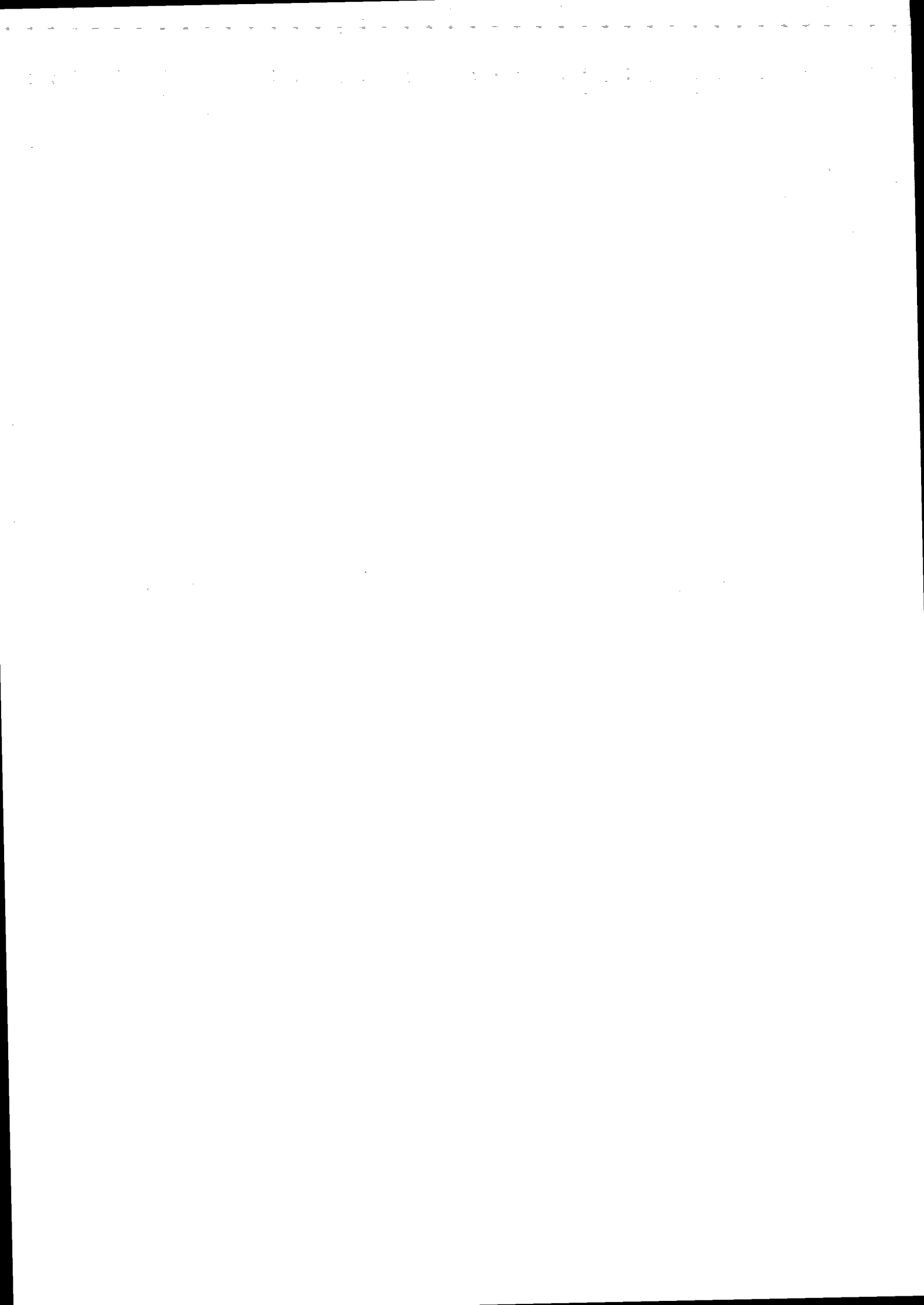
## 6.6 Opsamling

Jeg har nu set på alle de rå data fra de eksperimenter, jeg har udført og draget så meget information ud af dem, som jeg kan:

- For alle tre lipider - DMPC, DMPC-d54 og DC13PC - ser jeg en pludselig stigning i repeat distance ved faseovergangstemperaturen efterfulgt af et fald. Stigningen er størst for DC13PC.
- For DMPC og DMPC-d54 ser jeg sidetoppe i ripple fasen, men de optræder ikke altid lige tydeligt igennem hele ripple fasen. Dette kan muligvis skyldes, at ripple fasen er lang tid om at stabilisere sig, og at jeg ikke har givet lang tid nok i eksperimenterne. For DC13PC ser jeg kun svage eller ingen sidetoppe overhovedet, og dette har muligvis samme forklaring. Effekten af at give lang stabiliseringstid er dog ikke stor, idet jeg kun ser lidt tydeligere sidetoppe, og variationen i repeat distance er uændret.
- Jeg ser generelt for alle serier en større intensitet i toppene og smallere toppe i den flydende krystallinske fase end i ripple fasen. Umiddelbart vil jeg tro, at det skyldes større gitterorden i den flydende krystallinske fase.
- Ligeledes er det generelt for alle serier, at forholdet mellem bredden af første og anden ordens toppene er større i ripple fasen end i den flydende krystallinske fase. Dette er mere udpræget for DMPC og DMPC-d54, hvor forholdet er ca. 3-4 i ripple fasen mod ca. 1.5-2 i den flydende krystallinske fase, end for DC13PC, hvor det er ca. 2-3 i ripple fasen mod ca. 1-2 i den flydende krystallinske fase. På grund af smearingen er disse aflæste forhold lidt for store (se afsnit 6.2). Dette passer ikke godt med en parakrystallinsk model for de multilamellare vesikler, som forudsiger, at forholdet er ca. 4, og at toppene er bredere i den flydende krystallinske fase end i ripple fasen (idet repeat distance falder i den flydende krystallinske fase); jvf. ligning 6.1. Der er større mulighed for, at det passer med Caillés  $\eta$ -koefficienter, som kan variere med både kompressibilitetsmodulus, elasticitetsmodulus, temperatur og  $q$ -værdi for toppenes position.







# Kapitel 7

## Resultater

I dette kapitel vil jeg koncentrere mig om at se på de resultater, jeg får efter desmearingen af de eksperimentelle data. Det eneste, jeg vil se på i de desmearede spektre, er positionen af toppene. Efter desmearingen kan toppenes form ikke længere gives nogen fysisk fortolkning, idet den i for høj grad afhænger af de konkrete parametre i desmearingsprocessen.

Jeg opdeler kapitlet så de forskellige lipider først behandles hver for sig, hvorefter jeg sammenligner resultaterne for lipiderne i en opsamling.

Allerførst vil jeg dog beskrive de problemer, jeg er stødt på i forbindelse med desmearingen, og hvordan jeg har forsøgt at løse dem.

### 7.1 Problemer ved desmearing

Når man skal udføre en desmearing af et spektrum fra Kratky kameraet med ITR-proceduren (se afsnit 4.3), er der en del parametre, som skal sættes. Der er specielt tale om

- afgrænsning af spektret mht.  $q$ -værdi (kun datapunkter, der ligger indenfor filtergrænsen kan tages med, og det vil ikke være nødvendigt at tage høje  $q$ -værdier (hvor der kun er baggrund) med).
- støjniveau. Denne parameter bestemmer, hvilke områder top genkendelsesproceduren anerkender som toppe, og hvilke der anses for at være støj.
- antal datapunkter i de forskellige områder af spektret. Der tages mange punkter med i de områder, hvor der er toppe og få i de områder, hvor der ikke er toppe.



- antal spline-funktioner.
- $\lambda$ -værdien for stabilisering.
- mange andre parametre, som jeg ikke vil beskrive nærmere, da jeg ikke har varieret dem. Som eksempel kan nævnes skridtlængden i  $q$ -værdi for ekstrapolation til  $q = 0$  (denne har jeg som den eneste af disse parametre rent faktisk varieret ganske få gange, da programmet ellers ikke kunne køre).

Det kan være ganske svært at styre samspillet imellem variationer af alle disse forskellige parametre. Man varierer parametrene for en desmearing, indtil man er tilfreds med desmearingen. Jeg har fortrinsvis brugt to kriterier for, hvornår en desmearing er god:

- Den smearede desmearede funktion, som man fitter til de eksperimentelle data, skal have top-position ved samme  $q$ -værdi som de eksperimentelle data (og toppens form skal ligne den eksperimentelle top).
- Den desmearede funktion skal have symmetriske toppe (ellers er det svært (og slet ikke entydigt) at finde deres centrum).

Jeg fokuserer altså på toppene i vurderingen af en desmearing. Resten af spektrene imellem toppene vil jeg ikke tillægge så stor vægt; der kan godt være store oscillationer i den smearede funktion, og den smearede behøver ikke nødvendigvis at ligne den eksperimentelle godt.

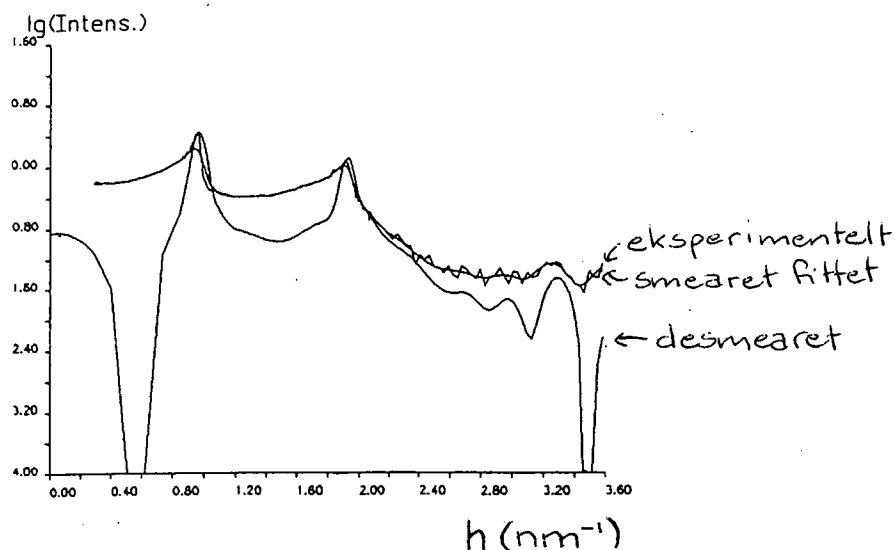
Dette skyldes naturligvis, at jeg fortrinsvis er interesseret i at bruge spektrene til at finde toppenes nøjagtige positioner. Da de variationer, jeg er "på udkig efter", oven i købet er meget små (få Ångstrøm) er det essentielt, at jeg aflæser toppenes position korrekt.

Det sker meget sjældent, at begge de to kriterier bliver fuldstændigt opfyldt på en gang, og resultatet vil basere sig på en subjektiv vurdering foretaget med det blotte øje. Denne kan være svær at foretage, og man kan let blive udsat for synsbedrag af forskellige slags. Der kan derfor ske det, at to spektre, som for de eksperimentelle data syner ens, kan give meget forskellige top-positioner og grad af symmetri efter desmearing. Der er så ikke andet at gøre end at prøve at desmeare om igen.

Alt i alt lyder desmearingen som en meget speget affære, men efterhånden som man får en træning i at gøre det, begynder det at gå nemmere. Det kan dog ikke undgås at visse spektre giver store problemer og er svære at desmeare tilfredsstillende. Punkter i de følgende karakteristikker for repeat distance,





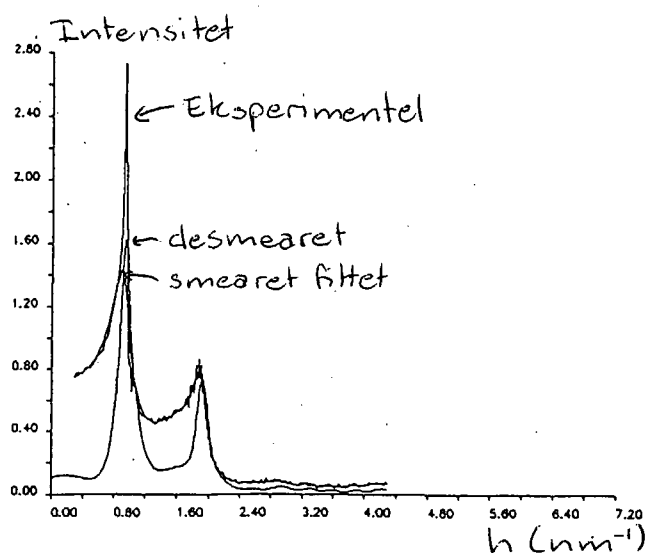


**Figur 7.1:** Et eksempel på et desmearet spektrum, der har store oscillationer ved lave  $q$ -værdier. De tilhørende eksperimentelle data er også vist.

som er fremstillet fra sådanne spektre, vil jeg markere med en ring. Jeg vil kort beskrive nogle af de konkrete aspekter, der kan være problematiske i en desmearing.

Et problem, som jeg typisk støder på, er at den desmearede funktion udviser meget store oscillationer for små  $q$ -værdier. Jeg har vist et eksempel på dette i figur 7.1. Da de kan ligge meget tæt på første ordens toppen, kan de have den effekt, at toppen bliver stærkt asymmetrisk, og nummer to kriterie for en god desmearing er dermed ikke opfyldt. Man kan forsøge at afhjælpe det ved at afgrænse det målte spektrum tættere på  $q = 0$  og ved at tage færre punkter med i området op til den første top. Det kan også hjælpe at ændre  $\lambda$ -værdien. Det er dog en effekt, som er meget svær at komme af med, og nok den største årsag til asymmetriske toppe i de desmearede funktioner.

Et andet problem, jeg ofte støder på, er at positionen af den smearede funktions toppe ligger lidt forskudt i forhold til de eksperimentelle data, selvom resten af toppens form er meget lig den eksperimentelle. Dette er illustreret i figur 7.2. Dette problem kan som oftest løses ved at sænke  $\lambda$ -værdien, men sænkningen kan til gengæld i nogle tilfælde have implikationer i forhold til toppens symmetri. Man kan så evt. prøve at øge antallet af spline-funktioner, men dette kan også medføre større oscillationer.



Figur 7.2: Et eksempel på at den smearede funktions top ligner den eksperimentelle meget, men har en lidt forskudt position af top punktet.

Efter desmearing bruger jeg kun aflæsning af første ordens toppenes positioner til at finde karakteristikker for repeat distance. Anden ordens toppene bliver alt for asymmetriske, til at de kan bruges.

Der er størst problemer med desmearingen for de spektre, hvor der er mest støj. Som beskrevet i sidste kapitel er der en del mindre statistik for de første spektre, jeg tog, end de senere, og det er da også dem, der giver de største problemer. Alle disse spektre med megen støj har jeg desmearet flere gange uafhængigt af hinanden og med forskellig vægt på de to kriterier. Dette har givet forskellige karakteristikker for repeat distance. Jeg må da forsøge at tage stilling til, hvilken karakteristikk, jeg stoler mest på.

De spektre, hvor der er mindre støj, er alle meget mindre komplicerede at desmeare, så der har jeg kun gjort det én gang (men grundigt naturligvis). Som en generel ledetråd for, hvorvidt de D-karakteristikker, jeg opnår efter desmearingen er fornuftige, vil jeg fortrinsvis bruge en sammenligning med plottene af de rå data vist i kapitel 6.

## 7.2 DMPC

For DMPC har jeg lavet to serier, hvor den ene har meget støj, og desmearingen af de rå data ikke var problemfri, mens den anden ikke havde meget



støj, og desmearingen stort set var problemfri.

Efter desmearing af spektrene aflæses alle Bragg-toppenes positioner som centrum for de tilsvarende lorentz-kurver, hvorefter de omsættes til værdier for repeat distance ved ligning 4.7. For første serie på DMPC har jeg gjort dette to gange. Dette resulterer i karakteristikker for repeat distance vist i figur 7.3. Det er bemærkelsesværdigt for begge desmearinger, at anden opvarmning giver en betydeligt større anomal top end første opvarmning. Dette sås kun svagt for de rå data. Der er ivotrigt ikke stor forskel på de to desmearinger. Den største forskel er, at niveauet for repeat distance i ripple fasen er en smule højere for anden desmearing end for første. Dette er ikke så mærkeligt, da jeg som kriterie for anden desmearing har lagt stor vægt på, at første ordens toppen blev symmetrisk. På denne måde har jeg kunnet "skære" den nedre del af toppen, der indeholder sidetoppen fra ripple-længden, fra i aflæsningen. Dette imødekommer Nagle's formodning om, at negligering af sidetoppen giver en kunstigt lav værdi for D. Af denne grund vælger jeg også at tro mere på anden desmearing end på første.

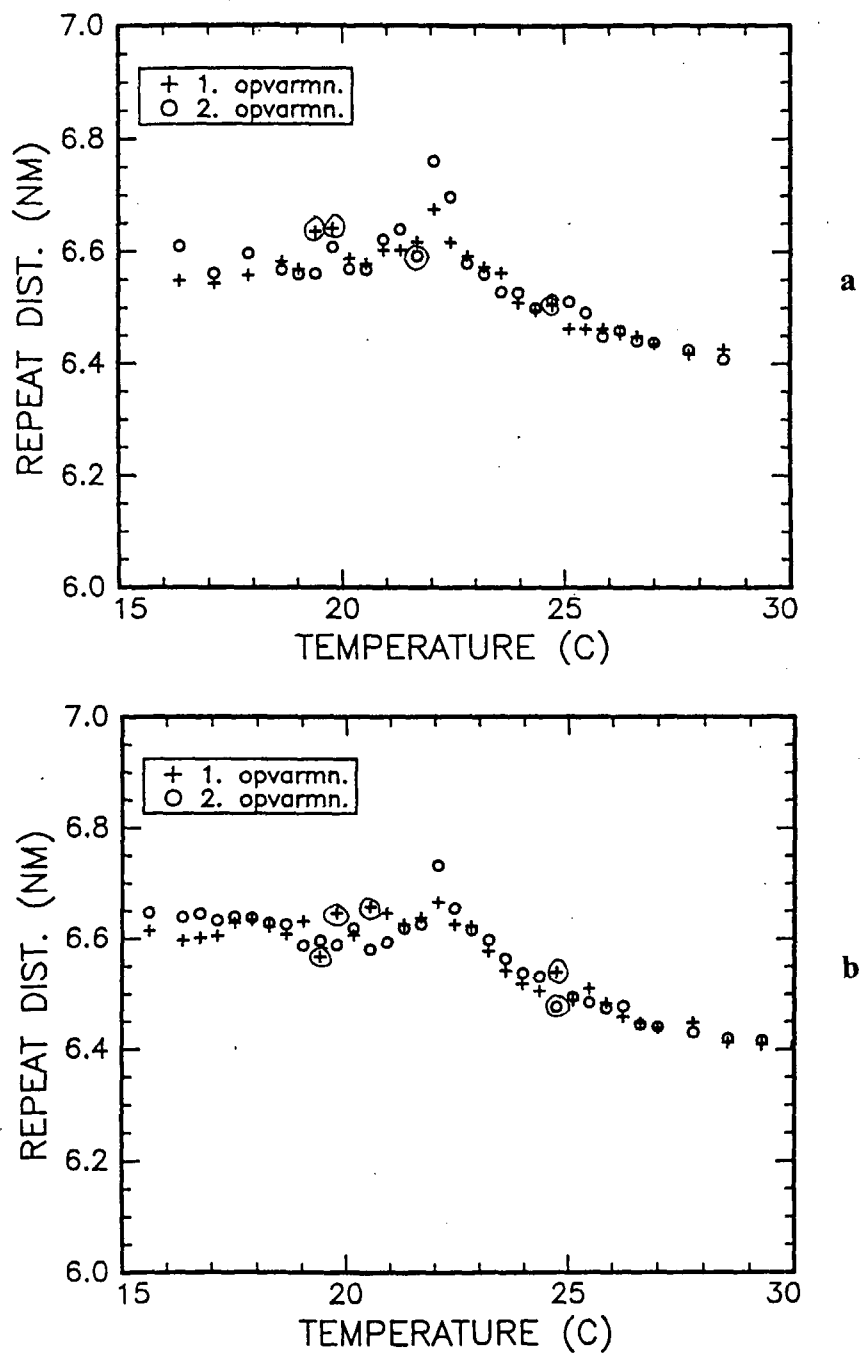
For både første og anden opvarmning (anden desmearing) i figur 7.3 er repeat distance i ripple fasen ca. 66-66.5 Å. I den flydende krystallinske fase ender repeat distance på ca. 64-64.5 Å. Den anomale top ligger for første og anden opvarmning hhv. ca. 0.5-1 Å og ca. 1-1.5 Å over niveauet for ripple fasen. Da usikkerheden er på ca.  $\pm 0.2$  Å, er der altså en signifikant anomal top.

For anden opvarmning ligger de første par punkter lidt højere end niveauet for resten af punkterne, og dette stemmer godt overens med, hvad jeg iagttag for de rå data.

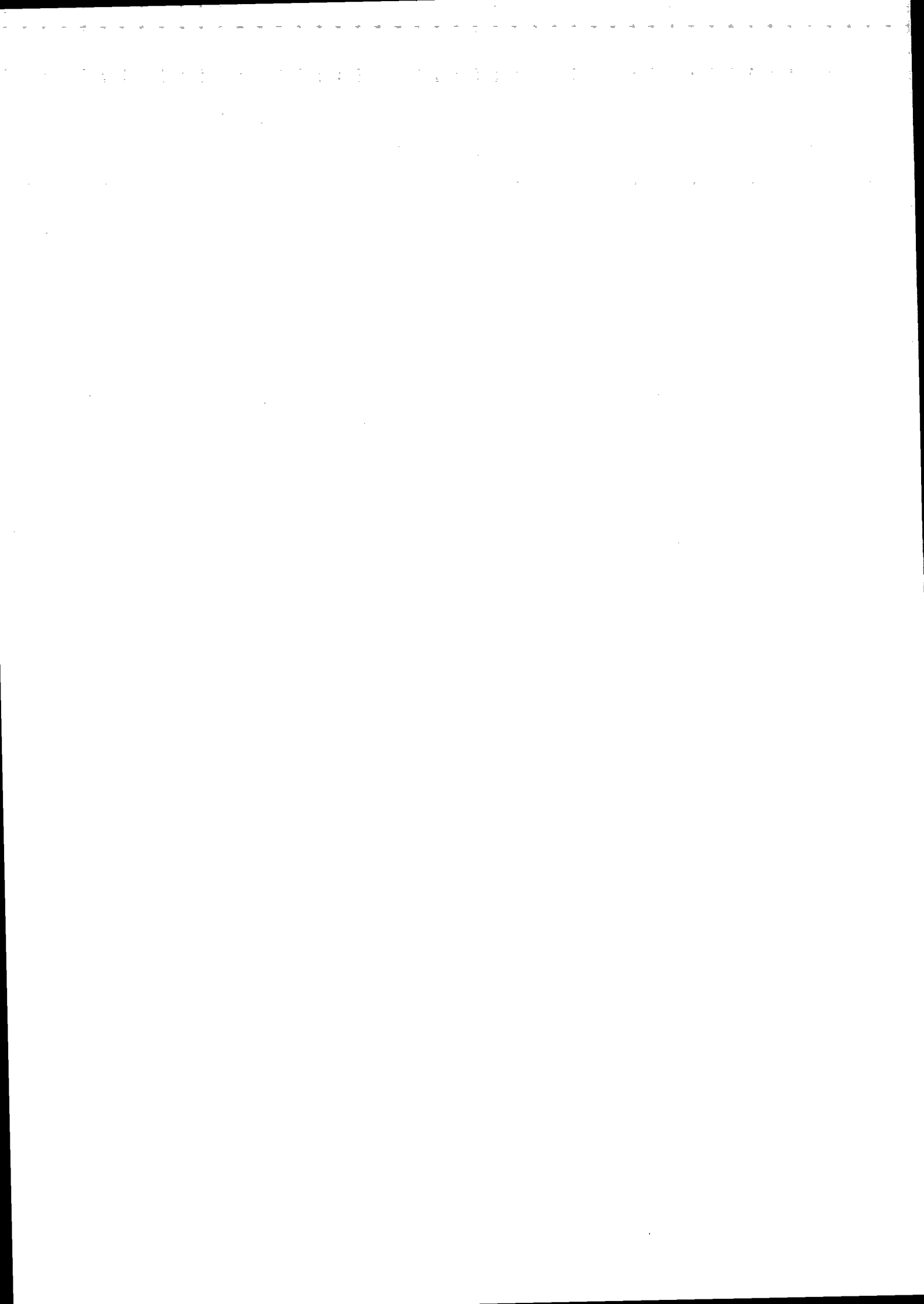
Ved desmearing af anden serie på DMPC har jeg brugt samme princip som ved anden desmearing af første serie. Dvs. jeg har lagt stor vægt på, at første ordens toppene i de desmearede spektre var symmetriske for på denne måde at separere sidetoppene fra. Dette har givet gode desmearinger generelt (da der også var en del mindre statistisk støj i denne serie), og jeg har derfor kun desmearet én gang. D-karakteristikkerne for de tre opvarmninger er vist i figur 7.4.

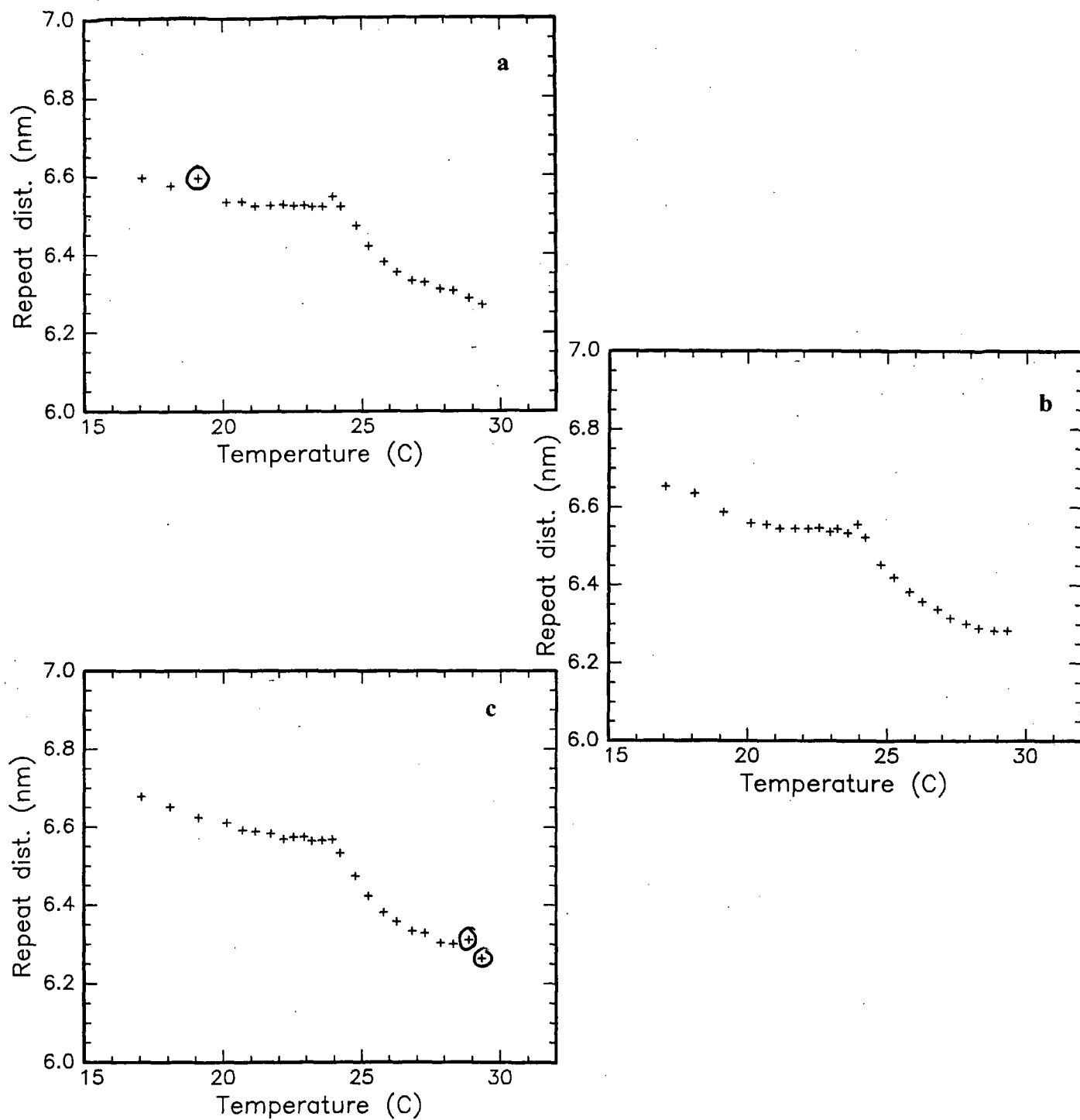
For alle tre opvarmninger er niveauet for ripple fasen ca. 65-65.5 Å. Niveauet for den flydende krystallinske fase ender på 62.5-63 Å, og den anomale top ligger ca. 0-0.5 Å over niveauet for ripple fasen. Dette er i overensstemmelse med de rå data. Der er ikke nævneværdig forskel på de tre opvarmninger. Generelt ligger de første 2-3 punkter højere end niveauet for de efterfølgende punkter i overensstemmelse med observationerne for de rå data.

Ialt har jeg set, at den anomale top i repeat distance observeres for DMPC ved røntgenspredning. Den varierer i størrelse fra 0-1.5 Å, men ses ikke så stor som den rapporteres for SANS eksperimenter i [Hønger et al., 1994] (ca.



**Figur 7.3:** Karakteristikker for repeat distance for DMPC første serie vist for (a) første desmearing og (b) anden desmearing. For hver desmearing er vist karakteristikkene aflæst for hhv. første og anden opvarmning, første ordens toppene. De punkter, hvor desmearingen har været dårlig, er markeret med en ring.





**Figur 7.4:** D-karakteristikkerne efter desmearing af DMPC anden serie (a) første, (b) anden og (c) tredje opvarmning. Kun første ordens toppene er brugt.



4-5 Å). Heller ikke niveauerne for repeat distance i de to faser svarer til de niveauer, der ses i SANS eksperimenterne. Dette skyldes formodentlig, at bufferen, som lipiderne opløses i, har forskellig sammensætning i eksperimenterne (jeg har forsøgt at minimere antallet af forskellige kemikalier i solventet).

Jeg har prøvet at fitte en potens lov med kritisk eksponent til D-karakteristikken i den flydende krystallinske fase for alle opvarmninger i begge serier. Den kritiske eksponent antages at være  $\psi = 1$  jvf. afsnit 3.1, således at funktionen, der fittes med er

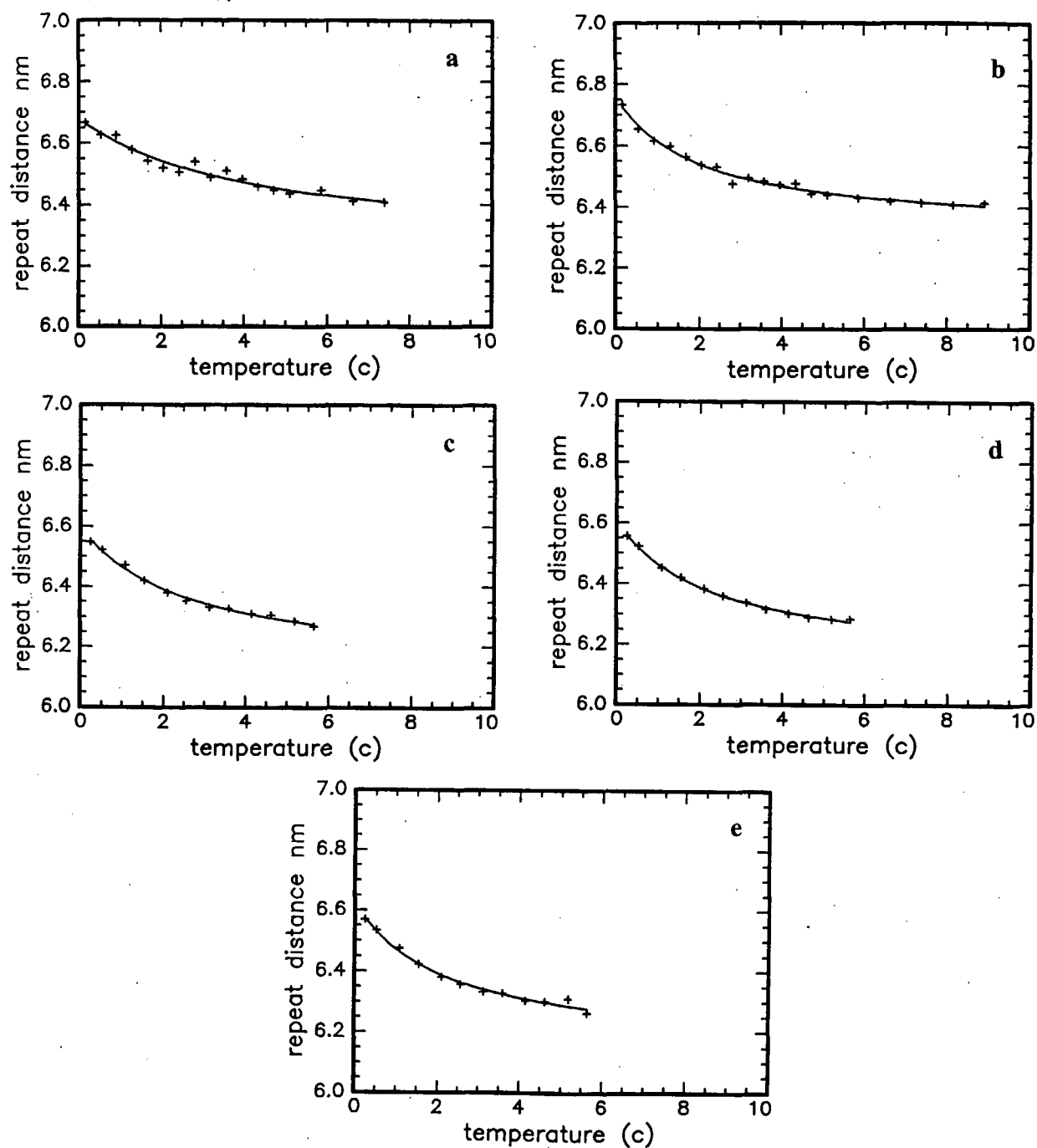
$$D(T) = D_0 + \frac{k}{(T - T_c)^\psi} \quad (7.1)$$

hvor  $D_0$ ,  $T_c$  og  $k$  er frie parametre og  $\psi = 1$ . Fittet udføres med en ikke-lineær mindste-kvadrat rutine i GENPLOT. Det giver kurver og parametre som vist i figur 7.5. Det angivne  $\chi^2$  er summen af kvadraterne på forskellen imellem de eksperimentelle punkter og den fittede kurve. De angivne  $\sigma$ 'er er de variationer, der skal påføres de enkelte parametre for at fordoble  $\chi^2$ . Det er gode fit (set udfra værdierne af  $\chi^2$ ), der giver en pseudokritisk temperatur ca. 2–3°C under faseovergangstemperaturen (her er overgangstemperaturen taget som det målepunkt, hvor D-karakteristikken "vender"). Da fitning af potens love med kritiske eksponenter til eksperimentelle data er kendt som et meget tvetydigt og tvivlsomt område, er jeg gået lidt grundigere til værks med dette. I første omgang prøvede jeg at lade den kritiske eksponent være en fri parameter i fitningen, men dette gav ikke noget fornuftigt resultat. Det gav et dårligere fit, end når jeg fastholdt den kritiske eksponent til 1. Jeg benyttede derfor en anden metode, hvor jeg udnyttede, at  $D - D_0$  versus  $T - T_c$  i et log-log plot skal give en ret linie, hvis kurven følger en potens lov:

$$\log(D - D_0) = \log k - \psi \log(T - T_c) \quad (7.2)$$

Jeg plottede da data fra anden serie DMPC i et sådant log-log plot, bestemte manuelt de værdier af  $D_0$  og  $T_c$ , der gav den bedste rette linie, og kunne aflæse  $-\psi$  og  $\log k$  som hhv. hældningen af linien og liniens skæringspunkt med y-aksen. Hvis der fandtes en entydig løsning, ville den kunne bestemmes på denne måde. Det viste sig dog ikke at være tilfældet. Det var muligt at finde mange sammenhørende værdier af  $D_0$  og  $T_c$ , der gav lige gode rette linier, og vidt forskellige værdier for  $\psi$  og  $k$ . For forskellige  $T_c$ -værdier, kunne jeg lave et lige godt fit til en ret linie hver med forskellig  $D_0$ -værdi. I tabel 7.1 har jeg angivet resultaterne af fit til tre rette linier med forskellige par af  $D_0$  og  $T_c$ . Graferne med plottene er ikke vist, da det ikke er til at se forskel på hvor gode de er med det blotte øje.





Nr.	Serie	Opvarm.	$D_{nul}/\sigma$	$T_m - T_c/\sigma$	$k/\sigma$	$\chi^2$
a	1	1	62.6/0.054	4.24/1.32	1.7/0.72	0.26e-03
b	1	2	63.3/0.013	2.13/0.25	0.85/0.11	0.11e-03
c	2	1	61.2/0.025	2.86/0.41	1.23/0.24	0.65e-03
d	2	2	61.4/0.013	2.41/0.20	1.00/0.11	0.24e-04
e	2	3	61.5/0.028	2.35/0.42	1.01/0.23	0.12e-03

Figur 7.5: Fitning af potens lov fald med kritisk eksponent  $\psi = 1$  i den flydende krystallinske fase for alle D-karakteristikker for DMPC. På x-aksen er reduceret temperatur  $T - T_m$ .

$D_0$	$T_m - T_c$	$\log k$	$\psi$	$\chi^2$
6.35 nm	2.16	-0.0149	1.18	2.7e-02
6.3 nm	1.66	-0.20	0.77	1.1e-02
6.37 nm	4.36	0.849	2.04	3.4e-02

**Tabel 7.1:** Tabel for fit til en ret linie i et log-log plot med manuelt bestemt  $D_0$  og  $T_c$  og de fundne sammenhørende værdier for  $\psi$  og  $k$ .

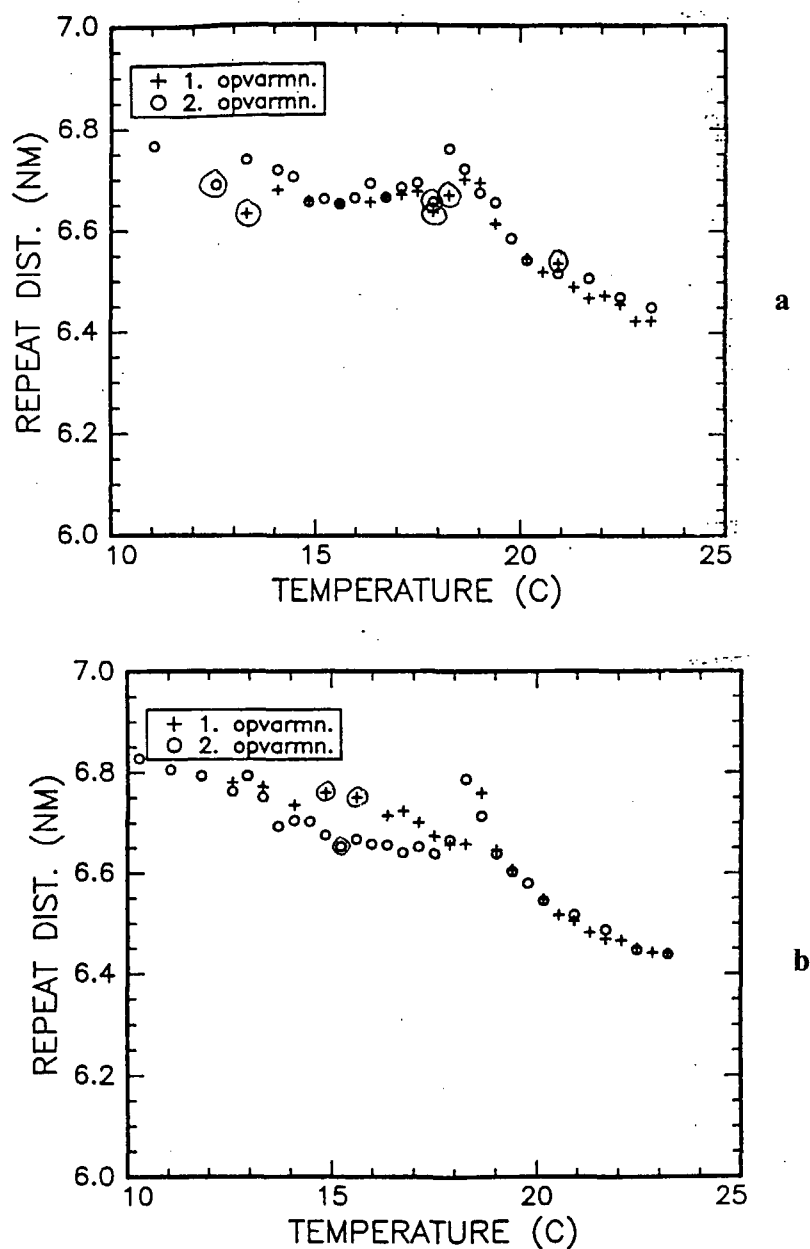
Konklusionen må blive, at der ikke er nok information i dataene til at fitte, når der er fire frie parametre. Den parameter, det er mest oplagt at kunne udelukke er  $D_0$ , men jeg har desværre ikke målt i et stort nok temperatur-område til at kunne bestemme  $D_0$ . Man kunne forestille sig, at man ud fra de tilgængelige data kunne give et godt bud på  $D_0$ , men i tabel 7.1 ses det, hvor stor forskel det gør at ændre  $D_0$  indenfor bare 0.1 nm.

For de følgende kurver (DMPC-d54 og DC13PC) vil jeg vise fittene med den kritiske eksponent fastsat til 1. Det er vigtigt at huske, at den eneste information, man kan drage af disse fit er, at **hvis** man antager at den kritiske eksponent er 1, så kan man finde værdier for  $T_c$ ,  $D_0$  og  $k$ , og man får et tal,  $\chi^2$ , for, hvor godt et fit, det giver. Selv hvis det er et godt fit, har man **ikke** vist, at den kritiske eksponent skal være 1, da data ikke indeholder information nok til dette.

### 7.3 DMPC-d54

De to af serierne på deutereret DMPC har meget støj, og er derfor desmearet to gange, mens den tredje ikke gav problemer, og kun er desmearet en enkelt gang. Karakteristikkerne for repeat distance i første serie er vist i figur 7.6. Den anomale top er mindre for første opvarmning end for anden opvarmning i begge desmearinger. Her er der ikke så stor forskel på niveauet for repeat distance i de to desmearinger, selvom jeg har brugt samme princip for de to desmearinger som for første serie ikke-deutereret DMPC. Den største forskel for de to desmearinger her er afvigelserne fra punkt til punkt i værdi. Anden desmearing giver en meget mere glat karakteristisk i den flydende krystallinske fase end første. Jeg vælger igen at tro mest på anden desmearing. For temperaturer mindre end  $T_m$  ses der for begge opvarmninger en tydelig tendens til et fald i repeat distance med stigende temperatur. Dette ses også for de rå spektre ved de laveste temperaturer (figur 6.9).

Niveauet for repeat distance i ripple fasen er ca. 66.5-67Å, mens det i den flydende krystallinske fase ender på ca. 64.5Å. Størrelsen af den anomale top



**Figur 7.6:** Karakteristikkerne for repeat distance for (a) første desmearing og (b) anden desmearing af DMPC-d54 1.serie. For hver af de to er vist aflæsninger for første og anden opvarmning, første ordens toppene. Punkter aflæst fra meget asymmetriske toppe er markeret med en ring.

er for første og anden opvarmning hhv. ca.  $1\text{\AA}$  og  $1-1.5\text{\AA}$  over niveauet for ripple fasen. Dette stemmer nogenlunde overens med tallene fra de rå data.

I anden serie adskiller første og anden opvarmning sig betydeligt fra hinanden i ripple fasen (se figur 7.7). Første opvarmning viser samme faldende tendens i repeat distance som begge karakteristikkene i første serie, mens anden opvarmning ikke viser denne tendens. Det ses i figur 7.7. Tværtimod er repeat distance konstant i hele ripple fasen i anden opvarmning. Dette ses også for de rå data.

Niveauet for repeat distance i ripple fasen er ca.  $66-66.5\text{\AA}$ , mens det i den flydende krystallinske fase ender på ca.  $63.5\text{\AA}$ . Den anomale top er for første opvarmning ca.  $0.5\text{\AA}$  over ripple fase niveauet, mens den for anden opvarmning er ca.  $1\text{\AA}$  over.

For tredje serie burde desmearingen være forløbet forholdsvis smertefrit, idet der ikke var megen støj på spektrene, men for første opvarmning var der et problem med filteret (også omtalt i kapitel 6), som desværre bevirkede, at dette ikke var tilfældet. Karakteristikkene for repeat distance er vist i i figur 7.8.

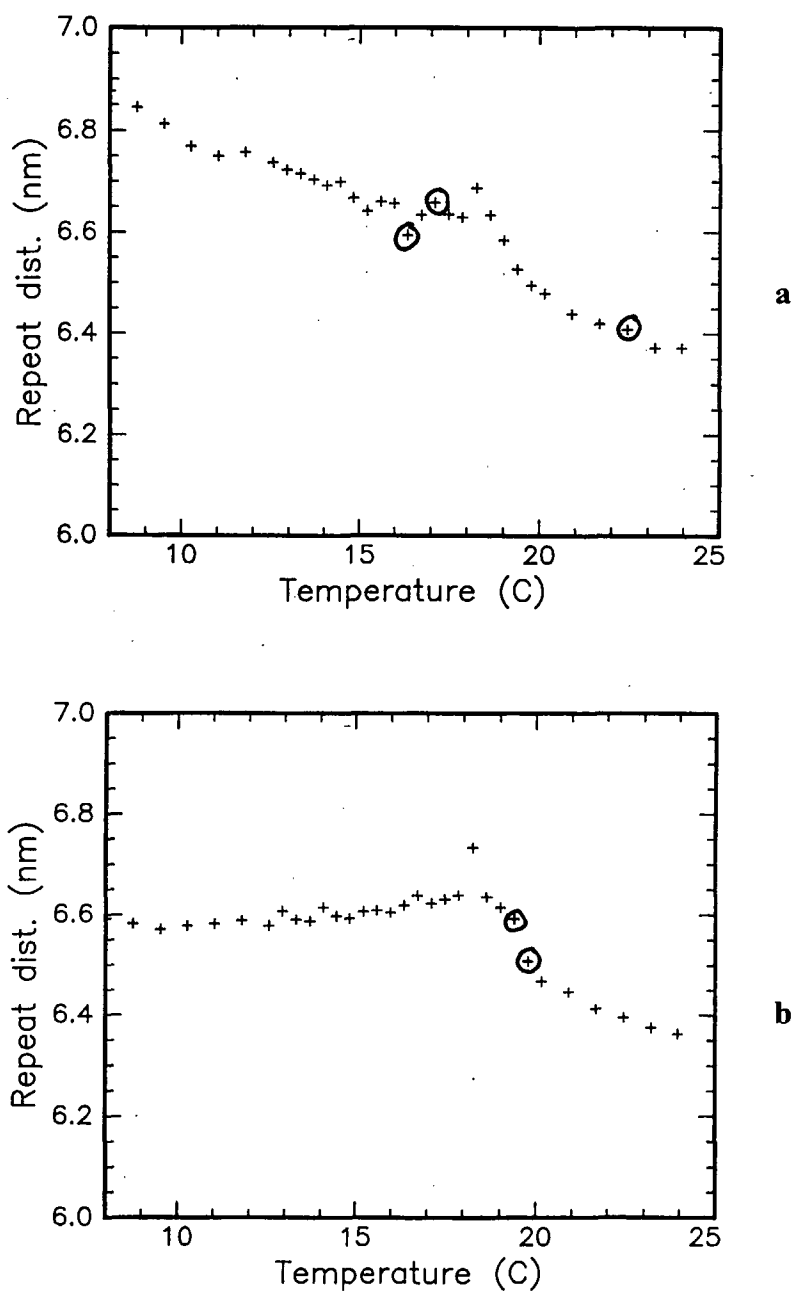
Niveauet for ripple fasen er ca.  $65-66\text{\AA}$  og for den flydende krystallinske fase ender det på ca.  $63.5-64\text{\AA}$ . Toppen har størrelserne hhv. ca.  $0.5-1\text{\AA}$  og  $1.5\text{\AA}$ .

For deutereret DMPC(-d54) observerer jeg en anomal top med SAXS. Ligesom for første serie på ikke-deutereret DMPC observerer jeg en tendens til, at anden opvarmning kan give en større anomali end første opvarmning. Størrelserne af de anomale toppe adskiller sig ikke fra størrelserne observeret for DMPC.

Også her har jeg fittet et potens lov fald med kritisk eksponent 1 (se ligning 7.1) til karakteristikkene i den flydende krystallinske fase, og resultaterne er vist i figur 7.9. Jeg har ikke fittet for tredje series første opvarmning, da karakteristikken var for dårlig til at det gav mening.

Dette giver gode fit, hvor den pseudokritiske temperatur findes til at ligge ca.  $1 - 2^\circ\text{C}$  under faseovergangstemperaturen, dvs. lidt tættere end ikke-deutereret DMPC.

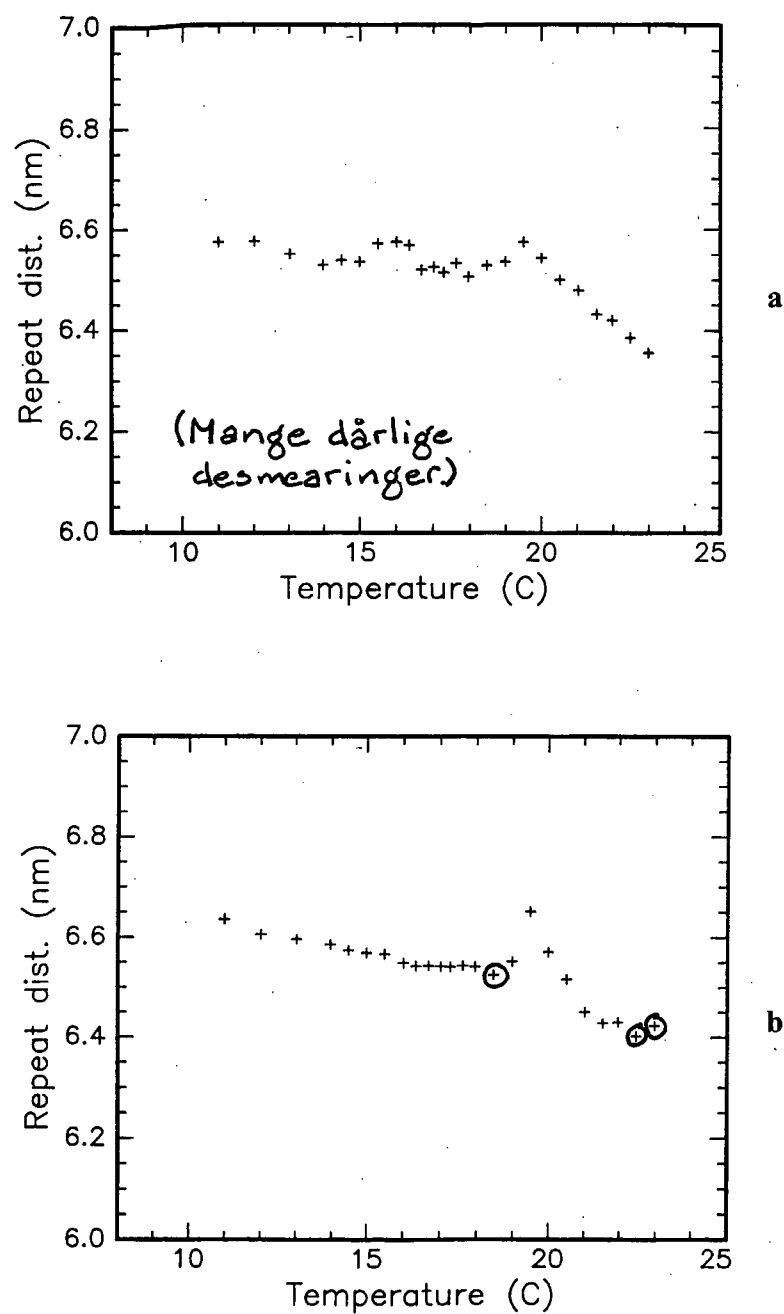
Jeg har ikke her prøvet at gå grundigere til værks med fitningen, da jeg allerede for DMPC viste, at det ikke giver nogen mening. Der er ikke information nok i data til at finde entydige sammenhørende værdier for  $T_c$ ,  $D_0$ ,  $\psi$  og  $k$ .



Figur 7.7: D-karakteristikker for DMPC-d54 anden serie første og anden opvarmning. Kun én desmearing er vist.

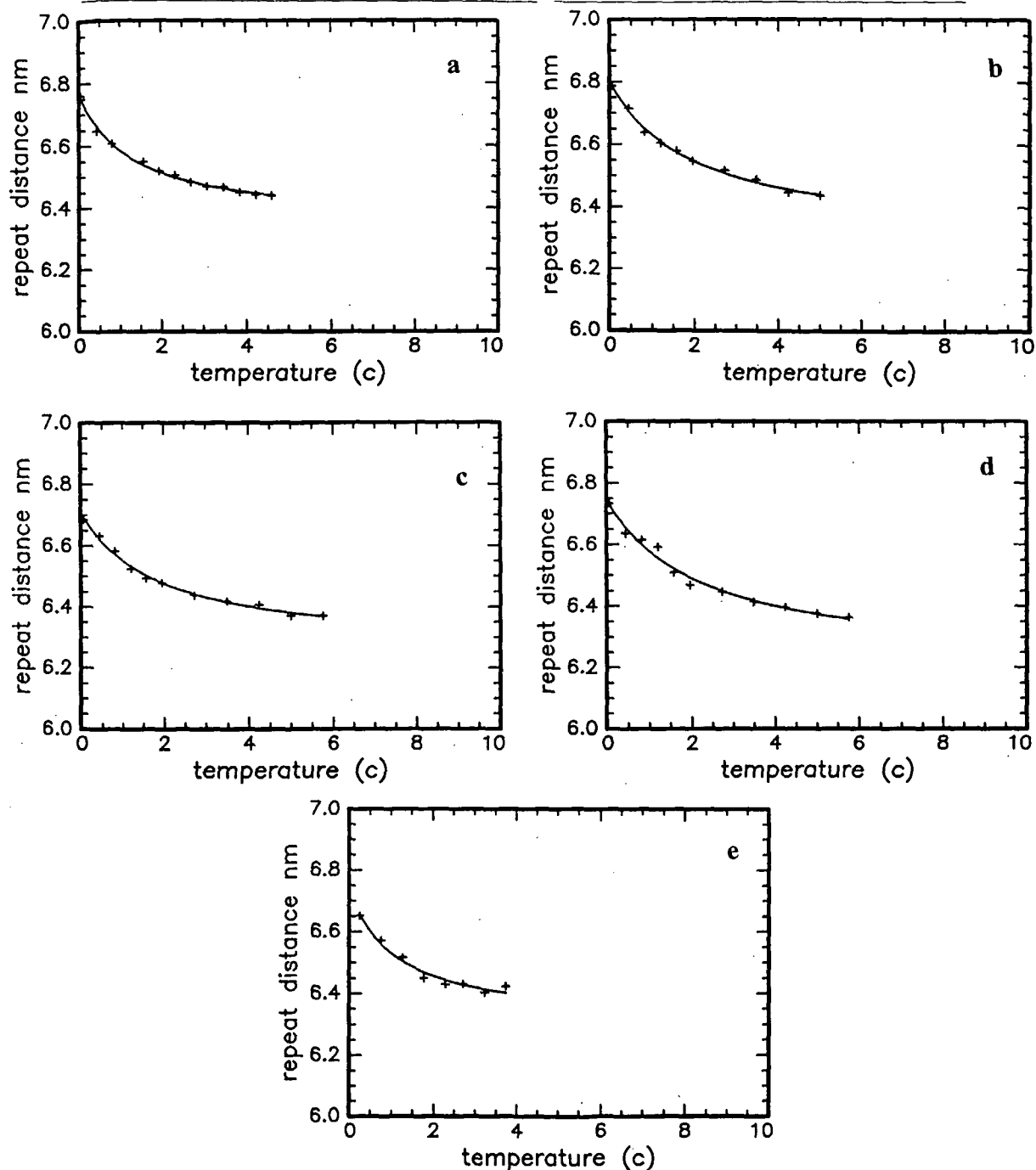






**Figur 7.8:** Karakteristikker for hhv. (a) første (med filterproblem) og (b) anden opvarmning af DMPC-d54 3. serie. For hver er vist karakteristik ud fra første ordens ordens toppe.





Nr	Serie	Opvarm.	$D_{nul}/\sigma$	$T_m - T_c/\sigma$	$k/\sigma$	$\chi^2$
a	1	1	63.5/0.013	1.32/0.15	0.53/0.07	0.62e-04
b	1	2	63.1/0.020	1.94/0.23	0.93/0.14	0.73e-04
c	2	1	62.6/0.019	1.99/0.25	0.87/0.14	0.80e-04
d	2	2	62.4/0.024	1.88/0.29	0.92/0.17	0.15e-03
e	3	2	63.0/0.043	1.45/0.49	0.51/0.22	0.29e-03

Figur 7.9: Fitning af potens lov med kritisk eksponent 1 i den flydende krystallinske fase for alle D-karakteristikker for DMPC-d54. På x-aksen er reduceret temperatur  $T - T_m$ .

## 7.4 DC13PC

Karakteristikkerne for repeat distance for de tre serier er vist i figurer 7.10, 7.11 og 7.12. Der var ikke store problemer med desmearingen, da der var god statistik på alle tre serier.

De absolutte niveauer for repeat distance for DC13PC er betydeligt lavere end for DMPC og DMPC-d54. Størrelsen af den anomale top er dog generelt større.

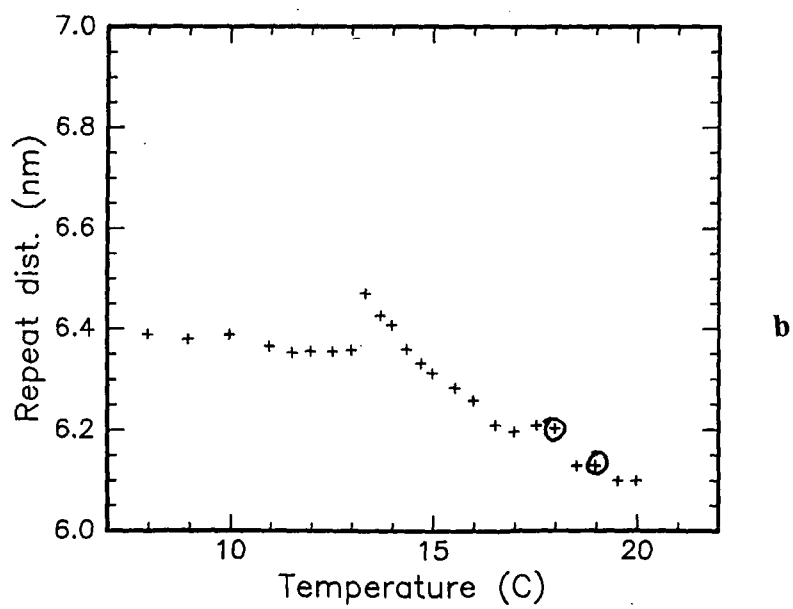
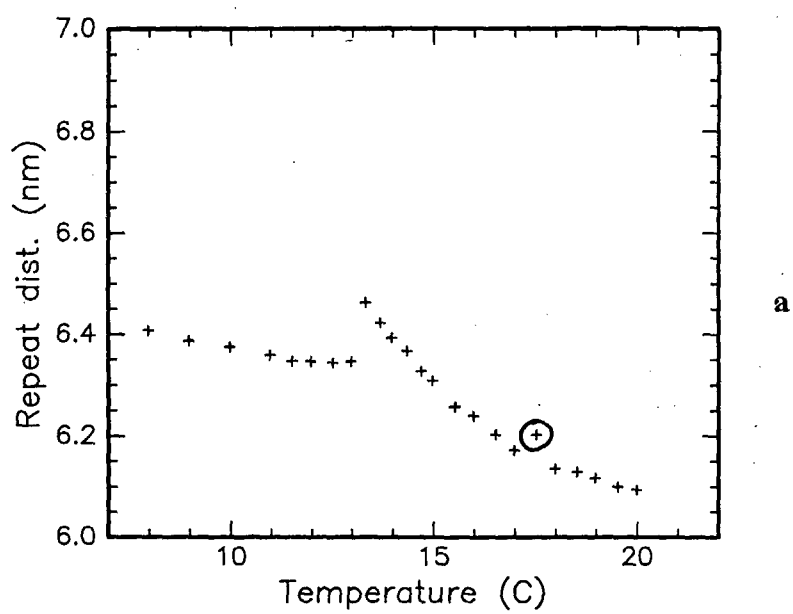
Niveauet for ripple fasen er ca. 63-64Å, for den flydende krystallinske fase ender det på ca. 60.5-61Å og toppen er ca. 1-2Å over niveauet i ripple fasen. (I den tredje serie ligger niveauerne en smule lavere end i første og anden serie). I anden og tredje serie ses der en lille tendens til at den anomale top er større i anden opvarmning end i første opvarmning. I tredje opvarmning er toppens størrelse ca. som i anden opvarmning. Dette stemmer kun overens med de rå data for tredje serie. For anden serie viste de rå data, at den anomale top er lidt mindre i anden opvarmning end i første opvarmning, og en del større i tredje opvarmning. I anden serie ser jeg en tendens til, at de første punkter ligger lidt over niveauet i ripple fasen, og dette er i overensstemmelse med de rå data.

Også for disse karakteristikker fitteder jeg et potens lov fald med kritisk eksponent ifølge ligning 7.1 i den flydende krystallinske fase, og resultaterne er vist i figur 7.13. Disse fit er ikke helt som forventet. Det er generelt anerkendt, at jo kortere lipidernes fedthale er, jo tættere er faseovergangstemperaturen på det pseudokritiske punkt. Disse fit giver dog pseudokritiske punkter, der er ca. 2 – 6°C under faseovergangstemperaturen, dvs. fjernere end for både DMPC og DMPC-d54. Det skyldes ikke, at der er tale om dårlige fit, for de er lige så gode som alle de forrige fit. Det må skyldes noget andet.

Det kan f.eks. skyldes, at 1 ikke er den rigtige værdi for den kritiske eksponent, og at man med en anden værdi (eller en anden funktionel form for kurven) ville finde fit, der gav en lavere  $T_c$ -værdi for DC13PC, end for DMPC og DMPC-d54. Dette lader ikke til at være tilfældet, idet jeg har prøvet at fitte med værdier for den kritiske værdi imellem 0.5 og 2, men ikke ser noget mønster for, hvad der giver bedste fit.

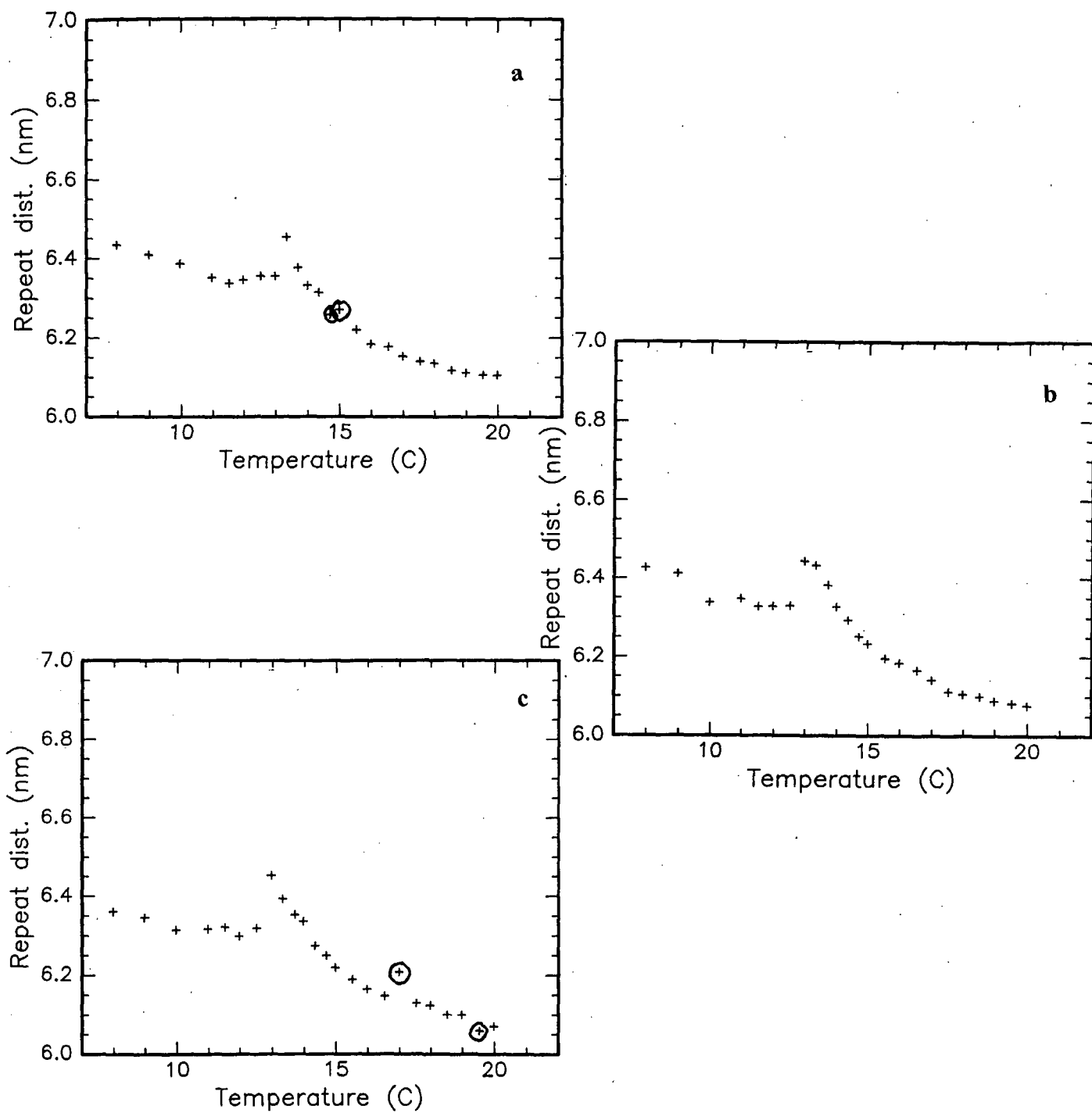
Det kunne også skyldes, at prøverne har en dårligere kvalitet f.eks. med hensyn til stabilisering, så data-punkterne ikke er korrekte. Imod dette taler dog den 4. serie på DC13PC, som har fået lang stabiliseringstid. De rå data fra denne serie afskiller sig ikke væsentligt fra de tre andre serier. En dårlig kvalitet kan også have at gøre med lamellariteten af prøverne. Hvis en vesikel har en lav lamellaritet (dvs. antallet af lameller i vesiklerne er lavt), vil udtrykket for Helfrich's repulsive undulationskraft ikke være som i ligning 2.20. Ud-





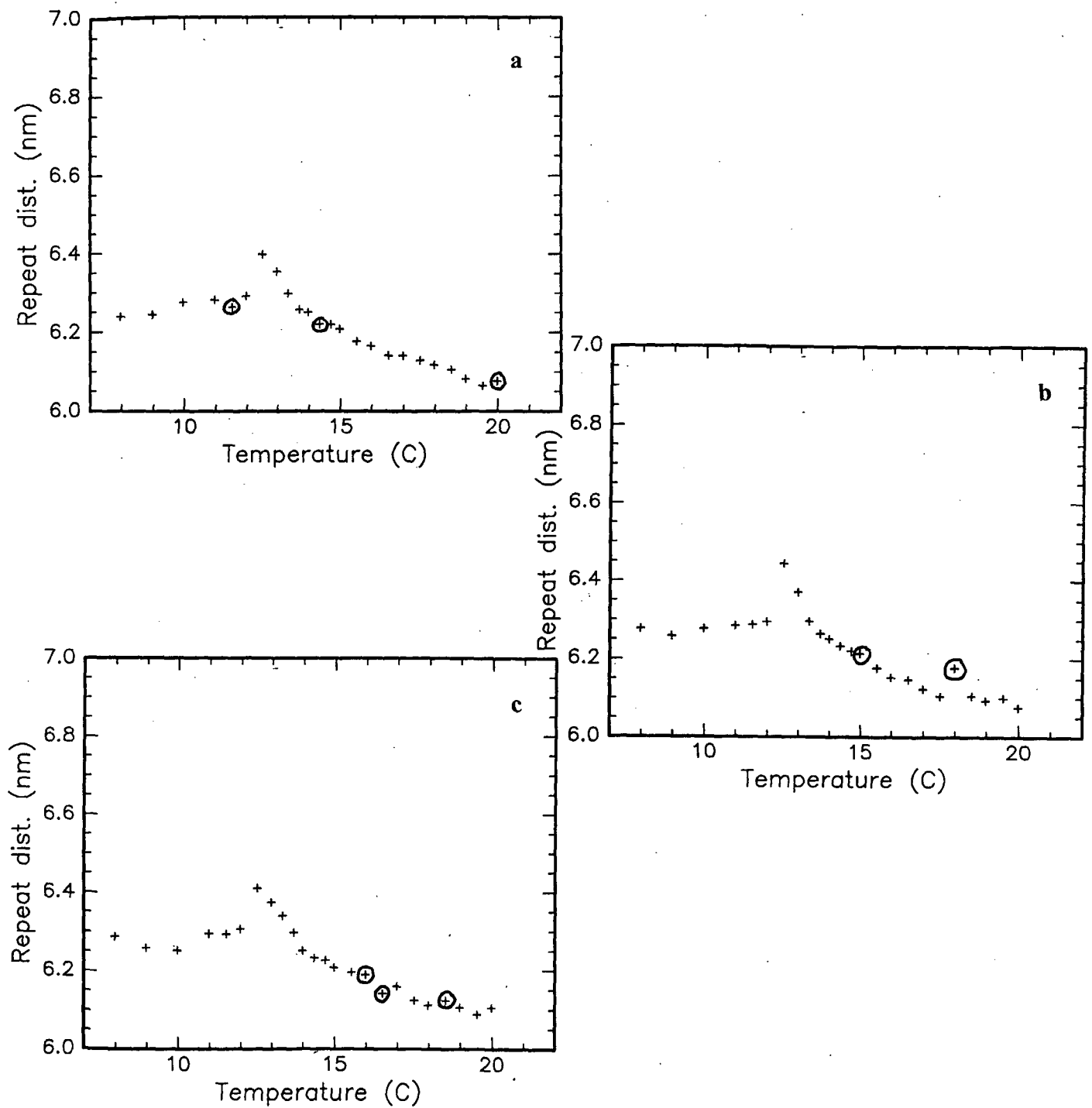
Figur 7.10: D-karakteristik for 1. serie DC13PC 1. og 3. opvarmning.



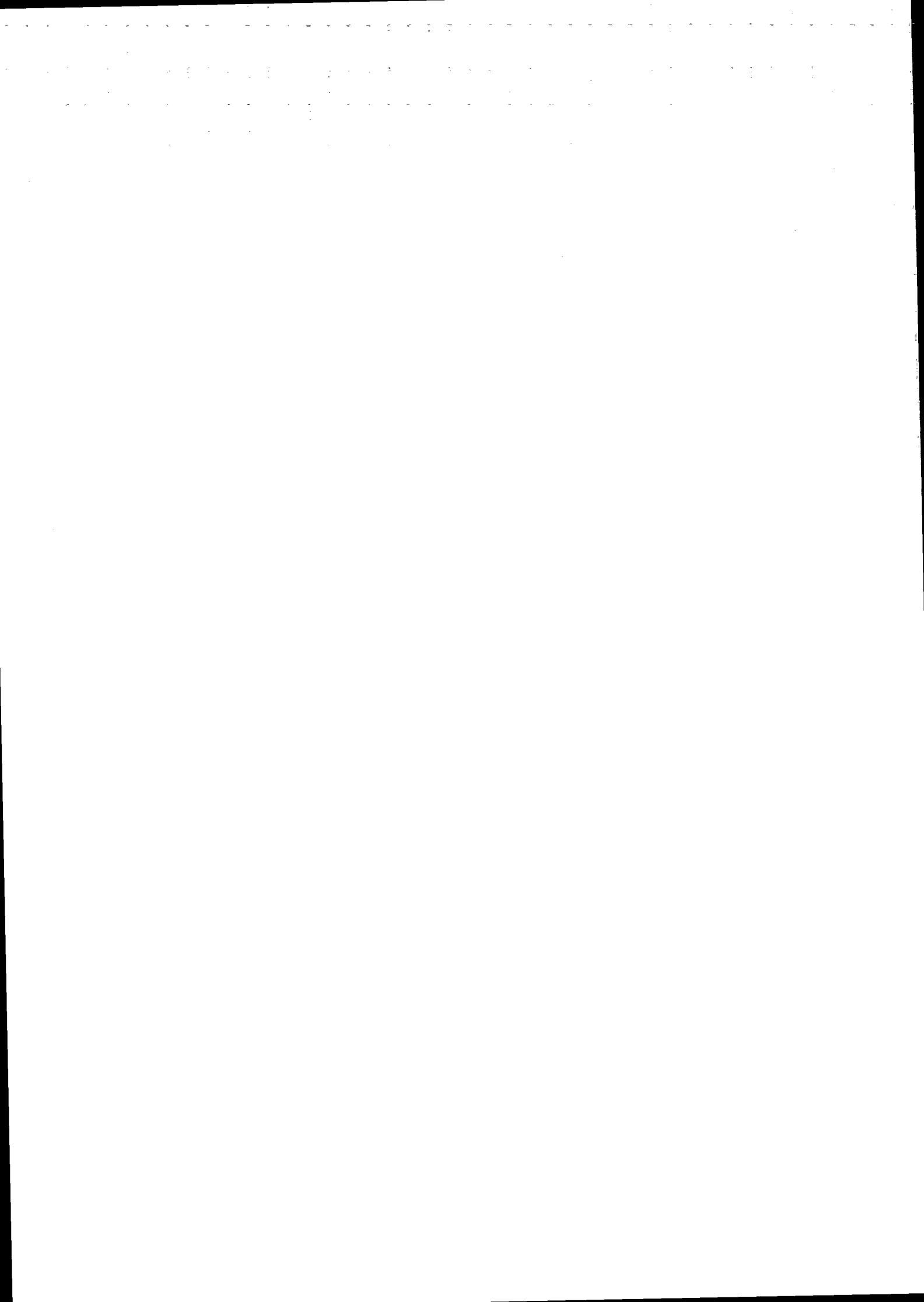


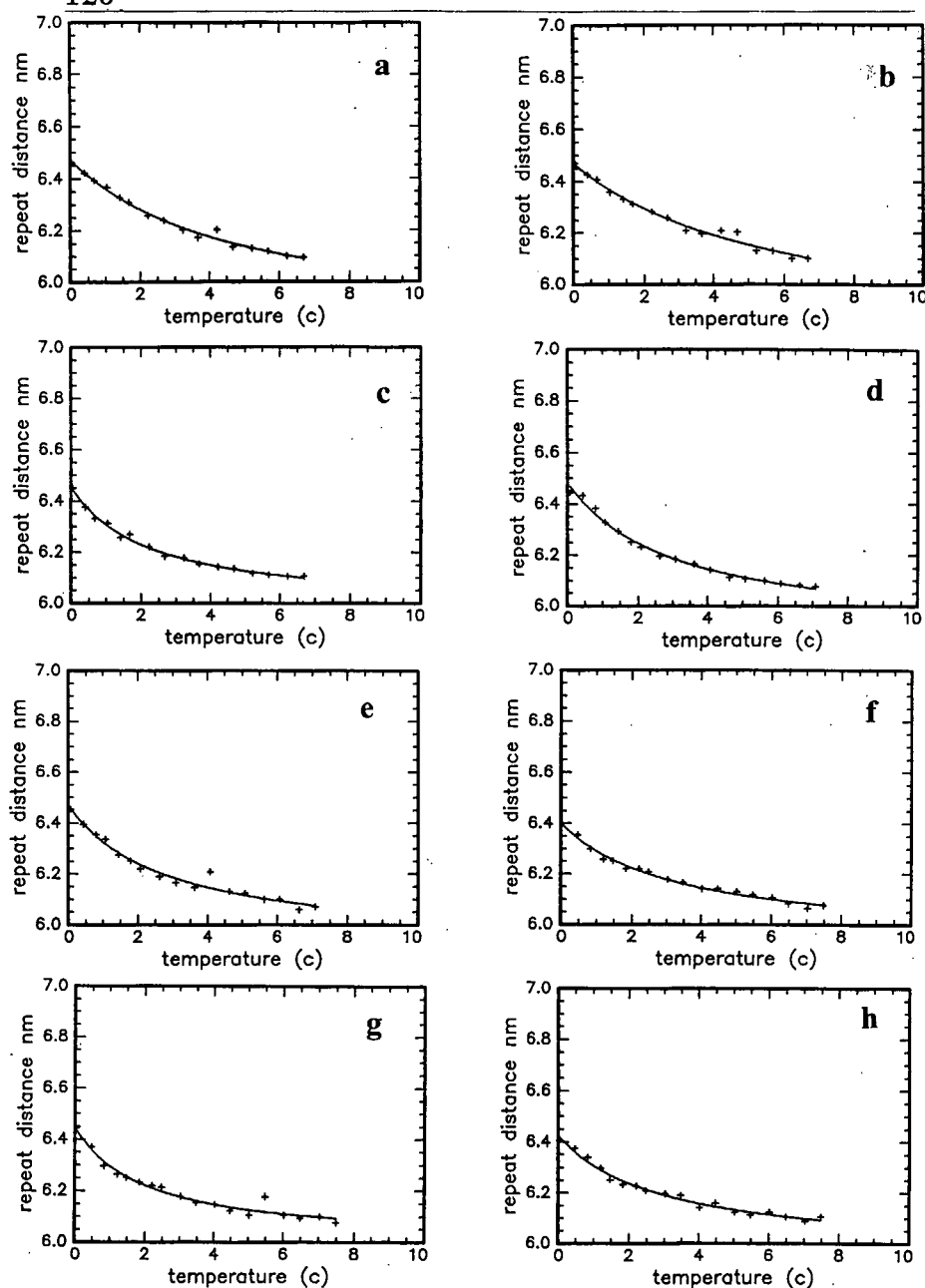
Figur 7.11: D-karakteristik for 2. serie DC13PC 1., 2. og 3. opvarmning.





Figur 7.12: D-karakteristik for 3. serie DC13PC 1., 2. og 3. opvarmning.





Nr.	Serie	Opvarm.	$D_{nul}/\sigma$	$T_m - T_c/\sigma$	$k/\sigma$	$\chi^2$
a	1	1	58.0/0.055	5.10/0.89	3.39/0.84	0.16e-03
b	1	3	57.8/0.086	5.91/1.47	4.06/1.47	0.25e-03
c	2	1	59.9/0.015	2.19/0.23	1.01/0.13	0.88e-04
d	2	2	58.9/0.029	3.11/0.44	1.80/0.32	0.18e-03
e	2	3	59.2/0.035	2.94/0.68	1.58/0.46	0.45e-03
f	3	1	59.4/0.022	3.31/0.44	1.53/0.25	0.11e-03
g	3	2	60.0/0.024	1.97/0.39	0.87/0.20	0.37e-03
h	3	3	59.6/0.025	2.98/0.48	1.38/0.27	0.17e-03

Figur 7.13: Fitning af potens lov fald med kritisk eksponent 1 i den flydende krystallinske fase for alle D-karakteristikker for DC13PC. På x-aksen er reduceret temperatur  $T - T_m$ .



trykket for Helfrich's undulationskraft, som ifølge [Hønger et al., 1994] skulle være skyld i den anomale top, er beregnet fra en model baseret på en uendelig stak af flade undulerende skiver, og tilnærmes altså bedst, når lamellariteten er stor. På denne måde kan også den store forskel på  $T_m - T_c$ , der er imellem de enkelte karakteristikker for DC13PC, forklares ved forskellig kvalitet af prøverne.

## 7.5 Opsamling

Jeg kan konstatere, at det ikke er trivielt at udføre desmearing af spektre, som dem jeg har med at gøre, hvor der er skarpe Bragg-toppe med en lille baggrund og mere eller mindre tydelige sidetoppe. Jeg har fortrinsvis valgt som kriterium for desmearing, at de desmearede toppe er symmetriske, samt at de smearede desmearede toppe er sammenfaldende med de eksperimentelt målte. På grund af symmetri-kriteriet vælger jeg forholdsvis lave  $\lambda$ -værdier for desmearingen (dvs. vigtighed af stabilisering er lille), så der bliver store oscillationer imellem toppene. Til gengæld får jeg valgt et udsnit af toppene, der så vidt muligt ikke omfatter sidetoppe. Desmearingen er sværere at udføre jo mere statistisk støj, der er på spektrene.

De karakteristikker, jeg ser for repeat distance efter desmearing, stemmer godt overens med de observationer, jeg har gjort for de rå data.

Jeg har for de tre lipider bestemt niveauerne for repeat distance i ripple fasen, på den anomale top og i den flydende krystallinske fase. For DC13PC er niveauerne i de to faser ca. 2-3 Å lavere end for DMPC og DMPC-d54, svarende til at der er to færre methylengrupper i hvert dobbeltlag. Til gengæld er den anomale top generelt lidt større for DC13PC. Man kunne måske have forventet, at den skulle være endnu større, hvis man sammenligner med forskellen imellem den anomale top for hhv. DMPC og DPPC (figur 3.1), men dette kan hænge sammen med kvaliteten af prøverne. Jeg ser nogle gange, at den anomale top kan være større i en series anden opvarmning, end i den første opvarmning. Dette kan f.eks. skyldes, at lamellariteten af prøven er blevet bedre i anden opvarmning. Det kunne også have noget at gøre med, at ripple fasens kvalitet er anderledes (evt. ikke stabiliseret nok) i anden opvarmning, men jeg ser ingen forskel på sidetoppene i spektrene for de pågældende prøver i hhv. første og anden opvarmning.

Jeg har fittet data-punkterne i den flydende krystallinske fase til ligning 7.1, med den kritiske eksponent fastholdt til 1, og  $T_c$ ,  $D_0$  og  $k$  som frie parametre. Det giver for alle kurver ret gode fit. Jeg har dog konstateret, at der ikke er information nok i de eksperimentelle data til at fitte, hvis ikke man ken-

der nogen af de fire frie parametre i forvejen. Når jeg alligevel har foretaget fittene er det for at få informationen om parametrene, hvis man antager, at man kender  $\psi$  til at være 1. Med disse fit finder jeg, at  $T_c$  for DMPC er ca.  $2 - 3^\circ\text{C}$  under  $T_m$ , for DMPC-d54 er  $T_c$  ca.  $1 - 2^\circ\text{C}$  under  $T_m$  og for DC13PC er  $T_c$  ca.  $2 - 6^\circ\text{C}$  under  $T_m$ . Dette er generelt større tal, end fundet i [Lemmich et al., 1995] og [Mitaku et al., 1983]. Da det er generelt anerkendt, at kritikaliteten af main faseovergangen stiger, jo lavere fedthalelængden er, passer det dårligt, at jeg finder større afstand mellem  $T_m$  og  $T_c$  for DC13PC end DMPC og DMPC-d54. Det kan enten forklares ved, at 1 ikke er den korrekte kritiske eksponent eller at kvaliteten (lamellariteten) af DC13PC prøverne er dårligere end de andre prøver<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>DC13PC havde en anden konsistens end DMPC både i pulverform og opløst (mere "klistret"), og man kunne også forestille sig at de to lipider reagerer lidt forskelligt på præparationen af prøver.

# Kapitel 8

## Konklusion og diskussion

### 8.1 Konklusion

Jeg har målt med småvinkel røntgenspredning på prøver af tre lipider i excess vandig opløsning; DMPC, DMPC-d54 (deutereret DMPC) og DC13PC. For hvert lipid har jeg målt spektre ved et antal temperaturer omkring main faseovergangstemperaturen,  $T_m$ . Af disse spektre uddrager jeg karakteristika for repeat distance som funktion af temperaturen henover  $T_m$ . I mine eksperimenter ser jeg følgende:

- Jeg kan med småvinkel røntgenspredning observere en anomal swelling for alle tre lipider bestående af en anomal top efterfulgt af et anomalt fald i repeat distance som funktion af temperaturen.
- Den anomale top er en smule større for deutereret DMPC(-d54) end for ikke-deutereret DMPC, mens repeat distance niveauerne i ripple fasen og den flydende krystallinske fase er stort set ens.
- Den anomale top er større for DC13PC, end for DMPC og DMPC-d54 (selvom der er enkelte målinger, hvor de to viser lige så store toppe). Repeat distance niveauerne i de to faser er for DC13PC ca. 2-3 Å lavere end for DMPC og DMPC-d54.

Udover disse konkrete "svar" på problemformuleringen for specialet, kan jeg uddrage følgende informationer af eksperimenterne:

- Hvis jeg bruger sidetoppe til (10)- og (20)-toppene som en indikator for ripple fasen, ser jeg tegn på, at jeg har et stabiliseringsproblem for





temperaturer tæt på  $T_m$ , idet sidetoppene i mange af eksperimenterne forsvinder.

- Jeg ser en større intensitet i toppene og smallere toppe i den flydende krystallinske fase, end i ripple fasen. Umiddelbart ville jeg tro, at dette kunne tilskrives større gitterorden.
- Jeg ser et forhold imellem første og anden ordens toppenes bredde, der ikke stemmer godt overens med en parakrystallinsk model, da det generelt er lavere end 4.
- Der er ikke information nok i de eksperimentelle data til at holde både den pseudokritiske temperatur, den kritiske eksponent, niveauet for repeat distance i  $L_\alpha$ -fasen og proportionalitetskonstanten som frie parametre ved fitning til ligning 7.1. Ved fitning finder jeg adskillige sammenhørende værdier af de frie parametre, der giver lige gode fit.

Jeg vil nu anføre argumenter for og imod hver af de to forklaringsmodeller for den anomale swellingopførsel baseret på mine eksperimenter og overvejelser. Den forklaringsmodel, der præsenteres i afsnit 3.1, kalder jeg "Unbinding modellen", og den, der præsenteres i afsnit 3.2 kalder jeg simpelthen "Nagle's model".

#### Argumenter for "Unbinding": Argumenter for "Nagle's model":

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Jeg observerer anomale toppe i mine eksperimenter.</li> <li>• Toppens afhængighed af fedt-hale længden (på grund af kritikalitetens afhængighed) er opfyldt for både mine eksperimenter og neutronspretnings-eksperimenterne.</li> <li>• Potenslov med kritisk eksponent 1 giver gode fit for både mine data og data fra neutronspretningseksperiment-erne.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Jeg observerer top-bredder, der kan passe bedst med Cailles <math>\eta</math>-koefficienter.</li> <li>• Eksperimenterne i [Zhang et al., 1995] har <b>meget</b> omhyggelig kontrol med stabilisering og termisk hysteres, samt god opløsningsevne [Nagle].</li> </ul> |
|---|--|

**Argumenter imod unbinding: Argumenter imod Nagle's model:**

- Ripple fasens kvalitet tæt på  $T_m$  er tvivlsom, så repeat distance niveauet i ripple fasen er tvivlsomt (for mine og muligvis også neutronspretnings-eksperimenterne).
- Der er ikke nok information i data til at fitte potens lov, når der er fire frie parametre.
- Den parakrystallinske model, der bruges til at opdele i vandlag og lipidlag, holder ikke (ifølge toppenes bredder i mine eksperimenter).
- $\eta$  bør ændre sig tæt på  $T_m$ , da andre eksperimenter viser, at både  $\kappa$  og  $K$  har anomal opførsel her.
- Da jeg observerer en anomal top må Nagle's model implicere, at selve lipidlaget kan være tykkere i den flydende fase, end i ripple fasen, hvor kæderne er udstrakte.

Mine eksperimenter giver mig ikke mulighed for at skelne utvetydigt imellem de to forklaringsmodeller. Der skal mere information til, for at kunne gøre det. Jeg vil alligevel udfra ovenstående hælde mest til unbinding-modellen, da der er flest gode argumenter for denne, og da argumenterne imod den ikke er endelige. De kan alle vise sig at kunne løses ved brug af bedre/andre eksperimenter, og en anden model-fitning. Argumenterne imod Nagle's model er det sværere at imødegå, og argumenterne for den ikke lige så slående som argumenterne for unbinding-modellen (dog har jeg ikke regnet konkret på det første argument for Nagle's model).

Alt i alt synes jeg mine eksperimenter mest understøtter unbinding-modellen.

## 8.2 Diskussion

For at opnå mere information om fænomenet, så man kan skelne bedre imellem de to forklaringsmodeller, kan man bruge to fremgangsmåder; man kan enten forsøge yderligere model-fit til de foreliggende data, eller man kan udføre nye eksperimenter og få supplerende data.

Som et første tiltag kunne man f.eks. forsøge at bruge en simpel model med

en antagelse om lipidernes specifikke volumen til at beregne selve lipidlagets tykkelse,  $D_l$  [Janiak et al., 1979]

$$D_l = \frac{D}{\left(1 + \frac{v_w}{v_l} \frac{1-c}{c}\right)} \quad (8.1)$$

hvor  $c$  er vægtforholdet imellem vand og lipid (lipid/(lipid+vand)) i vesiklerne, og  $v_w$  og  $v_l$  er hhv. vands og lipidets specifikke volumener. For fuldt hydrerede prøver er  $c$  givet som det vægtforhold, hvor den fulde hydrering opnås. Jeg kan f.eks. for mine eksperimenter på DMPC beregne hhv. lipidlagets og vandlagets tykkelse på denne måde. I ripple fasen ( $D = 66 \text{ \AA}$ ) finder jeg således, at  $D_l = 46 \text{ \AA}$  og  $D_w = 20 \text{ \AA}$  (det specifikke volumen er fundet i [Cevc] til at være  $0.94 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$  og vægtforholdet for fuld hydrering er fundet i [Janiak et al., 1979] til at være 0.29 %). I den flydende krystallinske fase ( $D = 64 \text{ \AA}$ ) finder jeg, at  $D_l = 45 \text{ \AA}$  og  $D_w = 19 \text{ \AA}$  (også her er det specifikke volumen fundet i [Cevc] til at være  $0.975 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ ). Hvis man skal bruge denne formel på faseovergangstemperaturen, skal man kende det specifikke volumen af lipiderne her eller gøre brug af en antagelse om størrelsen ud fra størrelserne i de to faser. Jeg kender ikke til nogen eksperimenter, der har fastsat det specifikke volumen på faseovergangstemperaturen, og det må være svært at finde på grund af kritikaliteten af faseovergangen. Det giver på den anden side heller ikke megen mening at bruge en antagelse om størrelsen, da der allerede i en sådan må ligge en stillingtagen til lipidlagets variation henover faseovergangen.

Man får altså ikke mere information ud af at bruge en sådan simpel model. Man kan så ty til de mere komplicerede modeller, hvor en forventet intensitetsfunktion for spredningen fra prøverne kan beregnes. En sådan model vil indeholde et antal frie parametre, som findes ved fitning til de eksperimentelle data, hvorved ny information, f.eks. om vandlagets og lipidlagets tykkelse, opnås.

Den allerede omtalte én-dimensionale parakrystallinske model er et eksempel på dette. Modellen indeholder nogle antagelser om, hvordan prøven spreder, hvis rigtighed er forudsætning for, at de frie parametre, som fittes, får meningsfulde størrelser. Antagelserne i den parakrystallinske model går i det væsentlige på, at en prøve kan opfattes som en masse segmenter, der hver især er en stak af  $N$  dobbeltlag, der ikke krummer. Hver af de  $N$  dobbeltlag har en middelposition, som kan fluktuere gaussisk uafhængigt af hinanden. Segmenterne antages ikke at vekselvirke. I [Lemmich et al., 1995] er en parakrystallinsk model for lipiderne med 8 frie parametre, bl.a. vandlagets tykkelse, lipidlagets tykkelse og lamellariteten, fittet til måledata fra neutronspredningseksperimenter. De tykkelser, der er kommet ud af det, kan ses

i figur 3.3 (læg mærke til, hvor meget de adskiller sig fra tykkelserne beregnet med den simple model ovenfor). Jeg mener det er tvivlsomt, i hvor høj grad forudsætningerne for den parakrystallinske model er opfyldt. Dels ser jeg i mine data top-bredder, der antyder, at en parakrystallinsk model ikke er brugbar, dels er det i [Zhang et al., 1995b] vist, at såkaldt "modificeret Caillé teori" [Zhang, Suter og Nagle, 1995] fitter bedre, især for højere ordens toppe. Denne teori bygger på de allerede omtalte Caillé  $\eta$ -koefficienter. Jeg har allerede flere gange omtalt (f.eks. afsnit 6.2), hvordan toppenes form i et spektrum asymptotisk afhænger af  $\eta$ -koefficienten. Til de eksperimentelle data fittes en funktion, som er et produkt af en modificeret strukturfaktor og kvadratet på formfaktoren. Formfaktoren giver essentielt elektrondensitetsprofilen i et enkelt dobbeltlag. Den modificerede strukturfaktor [Zhang, Suter og Nagle, 1995] tager højde for, at der kan optræde smektisk uorden i vesiklerne, dvs. at de enkelte dobbeltlag kan undulere, og det er i høj grad på dette punkt, at modificeret Caillé teori adskiller sig fra parakrystallinsk teori.

Det ville være oplagt at prøve at fitte disse to modeller til mine eksperimentelle data, men desværre er det ikke så simpelt. På grund af den store eksperimentelle smearing af spredningen, som der sker i Kratky kameraet, må man først smeare modellen, inden der fittes. Dette introducerer endnu en frihedsgrad i form af beamets profil i fitningen. Det vil ikke være muligt at gøre det omvendt - først desmeare de eksperimentelle data, og derefter fitte modellen - da desmearingen er alt for usikker. Formen af det desmearede spektrum er alt for følsomt i forhold til de parametre, der vælges under desmearingen; de genkendte toppe, antallet af punkter, antallet af splinefunktioner og stabiliseringsparameteren. Man skal altså bruge et program, der smearer modellen med de relevante beamprofiler, inden der fittes. Et sådant program har jeg ikke haft adgang til.

Grunden til, at det ikke har været nødvendigt i forbindelse med neutronspredningseksperimenterne og høj resolution røntgeneksperimenterne er, at der i begge tilfælde bruges en pinhole kollimering, hvor beamet er prikformet istedet for aflangt. Dette giver ikke så stor eksperimentel smearing, som man ser med et Kratky kamera.

Det andet tiltag, man kan gøre for at få mere information, er at udføre nogle flere eksperimenter, der supplerer med nye data.

Først og fremmest må man prøve at se på, hvordan kvaliteten af ripple fasen kan forbedres. F.eks. kan man prøve at lade prøverne starte med at stabilisere i gel fasen, hvorefter man hæver temperaturen til ripple fasen, og giver god tid til stabilisering (ifølge John F. Nagle [Nagle] kan der være stor termisk hysteresi i ripple fasen).



Jeg mener også, at det ville være interessant at få en mere detaljeret og systematisk viden om betydningen af solventets specifikke sammensætning. Jeg er ikke stødt på nogen litteratur omkring dette, men det vil være et meget omfattende arbejde at gennemføre fra bunden.

Man kan også udføre eksperimenter som dem jeg har lavet, men hvor der er tilsat membranstivende eller -blødgørende stoffer eller blandinger af forskellige lipider, for at undersøge, hvordan det påvirker swellingopførslen. Det kan give mere viden om, hvilke kræfter, der er i spil.

Et meget oplagt eksperiment vil være at lave en karakteristik af prøver af unilamellare vesikler, for at se, hvorvidt de udviser anomal swelling opførsel omkring  $T_m$ . Det kan gøres med samme slags eksperimenter som dem, jeg har lavet, blot med en anden dataanalyse, hvor elektrondensitetsprofilen for en enkelt unilamellar vesikel kan findes udfra et spektrum. Hvis unbinding modellen er korrekt, bør der i en sådan prøve observeres en brat ændring af elektrondensitetsprofilen henover faseovergangen svarende til figur 3.3.b.

Man kan lave eksperimenter med dynamisk lysspredning for at påvise, hvordan dobbeltlagene fluktuerer og undulerer omkring  $T_m$ . Dette kan jeg dog ikke gøre på RUC, da vi ikke har udstyret.

Endelig kan man, udover spredningseksperimenter, forestille sig at måle prøvernes mekaniske moduli henover  $T_m$  med rheologiske målemetoder. På denne måde kan anomalier i responsfunktioner detekteres og give en idé om størrelsesordenen og naturen af faseovergangens kritikalitet. (På RUC vil man også kunne måle den frekvensafhængige varmekapacitet og derigennem få en viden om relaxationstiden for ripple fasen). Sådanne eksperimenter vil nok ikke være simple at analysere, da de data, man kan opnå vil være for hele prøver, ikke for enkelte vesikler/dobbeltlag.

Alt i alt er der mange muligheder for at arbejde videre med dette emne. Der er endnu ikke et entydigt svar på, hvilken form for kontinuert faseovergang, det er, der er i gang omkring  $T_m$ , og gør første ordens faseovergangen imellem ripple fasen og den flydende krystallinske fase svag. Jeg mener, at mine eksperimenter fortrinsvis understøtter "unbinding" modellen, der foreslår, at det er en kritisk unbinding som følge af kraftige undulationer af dobbeltlagene forårsaget af en renormalisering af dobbeltlagenes krumningselasticitet. Det er interessant at fastslå, hvilken forklaring, der er den korrekte, da det vil give en basal viden om de essentielle kræfter i lipide dobbeltlag i et biologisk interessant temperaturområde.

# Litteratur

- [Arleth et al., 1993] Arleth, L., Holm, S., Petersen, M.K.D. og Specht, C.  
"Småvinkelspredning på P85"  
IMFUFA-projekt, 1993
- [Atkins] Atkins, P.W.  
"Physical Chemistry" fourth edition  
Oxford University Press, 1990
- [Caillé, 1972] Caillé, A.  
"Physique Crystalline - Remarques sur la diffusion  
des rayons X dans le smectiques A"  
C.R.Acad.Sc.Paris, serie B, **274**:891-893, 1972
- [Cevc] Cevc, G. editor  
Phospholipids Handbook  
Marcel Dekker, Inc., 1993
- [Cevc and Marsh] Cevc, G. og Marsh, D.  
"Phospholipid bilayers"  
John Wiley & Sons, 1987
- [Degiorgio] Degiorgio, V. editor  
"Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and  
Microemulsions"  
Proceedings of the International School of Physics  
"Enrico Fermi"  
Course XC  
Italian Physical Society, 1985  
North-Holland Physics Publishing
- [Doniach, 1978] Doniach, S.  
"Thermodynamic fluctuations in phospholipid bilayers"





- ayers"  
Journal of Chemical Physics **68**(11):4912-4916,  
1978
- [Fernandez-Puente et al., 1994] Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M.D.  
og Méléard, P.  
"Temperature and Chain Length Effects on Ben-  
ding Elasticity of Phosphatidylcholine Bilayers"  
Europhysics Letters **28**:181-186, 1994
- [Finegold et al., 1990] Finegold, L., Shaw, W.A. og Singer, M.A.  
"Unusual phase properties of dilauroyl phosphati-  
dylcholine (C12PC)"  
Chemistry and Physics of Lipids **53**:177-184, 1990
- [Glatter og Kratky] "Small Angle X-ray Scattering"  
edited by Glatter, O. og Kratky, O.  
Kap. 1-3, 13  
Academic Press, 1982
- [Glatter] Glatter, O.  
"Small-angle scattering and light scattering" i  
"Neutron, X-Ray and Light Scattering"  
Lindner, P. og Zemb, Th. (editors)  
Elsevier Science Publishers B.V., 1991
- [Glatter og Gruber, 1993] Glatter, O. og Gruber, K.  
"Indirect Transformation in Reciprocal Space: Des-  
measuring of Small-Angle Scattering Data from Par-  
tially Ordered Systems"  
Journal of Applied Crystallography **26**:512-518,  
1993
- [Goldenfeld] Goldenfeld, N.  
"Lectures on Phase Transitions and the Renormal-  
ization Group"  
Kap. 1-3, 5, 6, 8  
Addison-Wesley Publishing Company, 1992
- [Gompper og Schick] Gompper, G. og Schick, M.  
"Self-assembling Amphiphilic Systems"  
Phase Transitions and Critical Phenomena, Volume  
16, kap. 3,4



- 
- Edited by Domb, C. og Lebowitz, J.L.  
Academic Press, 1994
- [Haines et al., 1987] Haines, T.H., Li, W., Green, M. og Cummins, H.Z.  
"The Elasticity of Uniform, Unilamellar Vesicles of  
Acidic Phospholipids during Osmotic Swelling is  
Dominated by the Ionic Strength of the Media"  
Biochemistry **26**:5439-5447, 1987
- [Hatta et al., 1984] Hatta, I., Imaizumi, S. og Akutsu, Y.  
"Evidence for Weak First-Order Nature of Lipid  
Bilayer Phase Transition from the Analysis of  
Pseudo-Critical Heat"  
Journal of the Physical Society of Japan **53**(2):882-  
888, 1984
- [Helfrich, 1978] Helfrich, W.  
"Steric Interaction of Fluid Membranes in Multilayer  
Systems"  
Zeitschrift für Naturforschung **33a**:305-315, 1978
- [Hosemann og Bagchi] Hosemann, R. og Bagchi, S.N.  
"Direct Analysis of Diffraction by Matter", kap. 1-  
3, 6-9, 12  
North-Holland Publishing Company, 1962
- [Huang et al., 1993] Huang, T.C., Toroya, H., Blanton, T.N., Wu, Y.  
"X-ray Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate,  
a Possible Low-Angle Diffraction Standard"  
Journal of Applied Crystallography **26**:180-184,  
1993
- [Hønger et al., 1994] Hønger, T., Mortensen, K., Ipsen, J.H., Lemmich,  
J., Bauer, R. og Mouritsen, O.G.  
"Anomalous Swelling of Multilamellar Lipid Bilayers  
in the Transition Region by Renormalization of  
Curvature Elasticity"  
Physical Review Letters **72**:3911-3914, 1994
- [Hønger 1994] Hønger, T.  
"Interplay between dynamic properties and functionality  
of membranes"  
Ph.D. rapport DTU, 1994

- [Inoko og Mitsui, 1978] Inoko, Y. og Mitsui, T.  
"Structural Parameters of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Lamellar Phases and Bilayers Transitions"  
Journal of the Physical Society of Japan **44**:1918-1924, 1978
- [Ipsen et al., 1990] Ipsen, J.H., Jørgensen, K. og Mouritsen, O.G.  
"Density Fluctuations in Saturated Phospholipid Bilayers Increase as the Acyl-Chain Length Decreases"  
Biophysical Journal **58**:1099-1107, 1990
- [Israelachvili] Israelachvili, J.N.  
"Intermolecular and Surface Forces", 2. edition  
Academic Press, 1992
- [Janiak et al., 1979] Janiak, M.J., Small, D.M. og Shipley, G.G.  
"Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin"  
The Journal of Biological Chemistry **254**:6068-6078, 1979
- [Kratky og Stabinger, 1984] Kratky, O. og Stabinger, H.  
"X-ray small angle camera with block-collimation system an instrument of colloid research"  
Colloid and Polymer Science **262**:345-360, 1984
- [Laggner og Kriechbaum, 1991] Laggner, P. og Kriechbaum, M.  
"Phospholipid phase transitions: kinetics and structural mechanisms"  
Chemistry and Physics of Lipids **57**:121-145, 1991
- [Landau og Lifshitz] Lifshitz, E.M. og Pitaevskii, L.P.  
"Statistical Physics", 3rd edition part 1  
Course of Theoretical Physics, Volume 5  
Pergamon Press, 1980
- [Leikin et al., 1993] Leikin, S., Parsegian, V.A. og Rau, D.C.  
"Hydration Forces"  
Annual Review of Physical Chemistry **44**:369-395, 1993



- [Lemmich et al., 1994] Lemmich, J., Mortensen, K., Ipsen, J.H., Hønger, T., Bauer, R., Jørgensen, K. og Mouritsen, O.G.  
"Soft and Repulsive: Relationship between lipid membrane in-plane fluctuations, bending rigidity, and repulsive undulation forces"  
Modern Physics Letters B, 1994
- [Lemmich et al., 1995] Lemmich, J., Mortensen, K., Ipsen, J.H., Hønger, T., Bauer, R. og Mouritsen, O.G.  
"Pseudo-critical Behaviour and Unbinding of Phospholipid Bilayers"  
Preprint, 1995
- [Lipowsky og Leibler, 1986] Lipowsky, R. og Leibler, S.  
"Unbinding Transitions of Interacting Membranes"  
Physical Review Letters **56**:2541-2544, 1986
- [Ljunggren og Eriksson, 1985] Ljunggren, S. og Eriksson, J.C.  
"Comments on the Origin of the Curvature Elasticity of Vesicle Bilayers"  
Journal of Colloid and Interface Science **107**:138-145, 1985
- [McIntosh et al., 1987] McIntosh, T.J., Magid, A.D. og Simon, S.A.  
"Steric Repulsion between Phosphatidylcholine Bilayers"  
Biochemistry **26**:7325-7332, 1987
- [Mitaku et al., 1983] Mitaku, S., Jippo, T. og Kataoka, R.  
"Thermodynamic Properties of the Lipid Bilayer Transition"  
Biophysical Journal **42**:137-144, 1983
- [Morrow et al., 1992] Morrow, M.R., Whitehead, J.P. og Lu, D.  
"Chain-length Dependence of Lipid Bilayer Properties Near the Liquid Crystal to Gel Phase Transition"  
Biophysical Journal **63**:18-27, 1992
- [Mortensen, 1994] Mortensen, K.  
"Small-Angle Scattering on Soft Materials"  
Nukleonika **39**:169-184, 1994

- [Mouritsen, 1991a] Mouritsen, O.G.  
"Biologiske membraners fysik"  
Naturens Verden 60-72, 1991
- [Mouritsen, 1991b] Mouritsen, O.G.  
"Theoretical Models of Phospholipid Phase Transitions"  
Chemistry and Physics of Lipids **57**:179-194, 1991
- [Nagle] Personlig kommunikation med John F. Nagle via e-mail
- [Nagle et al., 1989] Nagle, J.F., Yokoi, C.S.O. og Bhattacharjee, S.M. i  
"Phase Transitions and Critical Phenomena" (ed.: Domb et al.)  
Volume 13, s. 235  
Academic Press, 1989
- [Pearson og Pascher, 1979] Pearson, R.H. og Pascher, I.  
"The Molecular Structure of Lecithin Dihydrate"  
Nature **281**:499-501, 1979
- [Ruggiero og Hudson, 1989] Ruggiero, A. og Hudson, B.  
"Critical density fluctuations in lipid bilayers detected by fluorescence lifetime heterogeneity"  
Biophysical Journal **55**:1111-1124, 1989
- [Schooley] Schooley, J.F.  
Thermometry s.172-183  
CRC Press, Inc., 1986
- [Tanford] Tanford, C.  
"The Hydrophobic Effect" second edition  
John Wiley & Sons, 1980
- [Tardieu og Luzzati, 1973] Tardieu, A. og Luzzati, V.  
"Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases"  
Journal of Molecular Biology **75**:711-733, 1973
- [Wack og Webb, 1989] Wack, D.C., og Webb, W.W.  
"Synchrotron x-ray study of the modulated lamellar phase  $P_{\beta'}$  in the lecithin-water system"  
Physical Review A **40**(5):2712-2730, 1989

- [Watts et al., 1981] Watts, A., Harlos, K. og Marsh, D.  
"Charge-Induced Tilt in Ordered-Phase Phosphatidylglycerol Bilayers Evidence from X-ray Diffraction"  
*Biochimica et Biophysica Acta* **645**:91-96, 1981
- [Worthington et al., 1973] Worthington, C.R., King, G.I. og McIntosh, T.J.  
"Direct Structure Determination of Multilayered Membrane-Type Systems which Contain Fluid Layers"  
*Biophysical Journal* **13**:480-494, 1973
- [Yeomans] Yeomans, J.M.  
"Statistical Mechanics of Phase Transitions", kap. 1-4  
Clarendon Press, 1992
- [Zhang et al., 1995] Zhang, R., Sun, W., Tristram-Nagle, S., Headrick, R.L., Suter, R.M. og Nagle, J.F.  
"Critical Fluctuations in Membranes"  
*Physical Review Letters* **74**:2832-2835, 1995
- [Zhang, Suter og Nagle, 1995] Zhang, R., Suter, R.M., Nagle, J.F.  
"Theory of the Structure Factor of Lipid Bilayers"  
*Biophysical Journal* **68**, 1995
- [Zhang et al., 1995b] Zhang, R., Tristram-Nagle, S., Sun, W., Headrick, R.L., Irving, T.C., Suter, R.M. og Nagle, J.F.  
"Small Angle X-ray Scattering from Lipid Bilayers is well described by Modified Caillé Theory, but not by Paracrystalline Theory"  
Preprint, 1995